

Lorraine Perciliano de Faria

**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES PULPARES EM DENTES SUBMETIDOS
A DIFERENTES TIPOS DE FORÇA**

Araçatuba - SP

2016

Lorraine Perciliano de Faria

**ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES PULPARES EM DENTES SUBMETIDOS
A DIFERENTES TIPOS DE FORÇA**

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. Osmar Aparecido Cuoghi

Araçatuba - SP

2016

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Faria, Lorraine Perciliano de.

F 224a Análise das alterações pulpares em dentes submetidos a
diferentes tipos de força / Lorraine Perciliano de Faria. – Araça-
tuba, 2016

50 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Osmar Aparecido Cuoghi

1. Movimentação dentária 2. Polpa dentária 3. Histologia

I. Título

Black D4

CDD 617.643

Dedicatória

À Deus

À Deus, pela sua infinita bondade, misericórdia e amor. Aquele que nos fortalece a cada manhã e torna possível até mesmo aquilo que parece impossível aos nossos olhos. Tudo o que tenho e sou é Teu!

Ao meu amado esposo, Rodrigo

Seu apoio incondicional, topando o desafio do casamento logo após o início do mestrado tornou possível que vencêssemos juntos mais uma etapa. Nem mesmo a distância e a saudade foram empecilho para lutarmos juntos por esse sonho. Obrigada por sempre estar ao meu lado em toda e qualquer decisão, por toda ajuda, por ser meu melhor amigo e porto seguro. Essa vitória também é sua! Te amo.

Agradecimentos especiais

À minha mãe Marileuza, não tenho palavras para agradecer tudo o que a senhora fez e faz por mim. Realmente o amor de mãe é inexplicável e quanto mais o tempo passa, mais me vejo em você. Todo meu amor, agradecimento e orgulho por ser sua filha! Quero um dia me tornar pelo menos uma parte de tudo o que a senhora é: exemplo de pessoa, mulher valorosa, mãe carinhosa, além de corajosa e batalhadora.

Ao meu pai Gilmar, por todo apoio e amor. Sempre ao meu lado e nunca medindo distância para estar comigo em todos os momentos. Obrigada por todos os ensinamentos, por todo o cuidado!

Ao Alcides, muito obrigada também por tudo o que sempre fez e faz por mim. Que alegria foi Deus ter te colocado nas nossas vidas, deixando nossa família ainda mais completa.

À Rosângela, que sempre buscou me ouvir com atenção, dando força e conselhos. Quantas vezes a conversa de 10 minutos duraram horas? Obrigada por sempre torcer por mim!

Aos meus irmãos, Maria Eduarda e João Victor, alegria da nossa casa e da nossa vida! Ainda que vocês não compreendam o que significa uma pós-graduação, que daqui a alguns anos eu consiga inspirar vocês a trilhar um caminho que mesmo sendo difícil, nos enche de satisfação.

Aos meus avós Ilda, Antônio e Alice, verdadeiras bênçãos de Deus na minha vida. Obrigada por todo o cuidado e amor em todos os momentos, e por vibrarem em cada passo que eu dava nessa jornada.

Aos meus sogros, Célia e Francisco, que além de serem pessoas maravilhosas, me acolheram como filha desde que entrei na família. Muito obrigada por terem me acolhido durante esses anos do mestrado e me dando todo o apoio durante esse período. Deus abençoe cada dia mais essa família.

Aos cunhados, Mi e Vinícius, tios, tias (obrigada por todas as orações tia Marilza, Cleide e Lurdinha) e primos que também sempre torceram por mim, muito obrigada!

Aos amigos

À Francielle Topolski, um dos maiores presentes que o mestrado me trouxe. Obrigada pela amizade, companhia, pela ajuda e companheirismo nas mais diversas etapas laboratoriais desse trabalho. Ter seu apoio e ajuda tornou possível e exequível a árdua tarefa dos procedimentos em animais.

Às amigas da pós e companheiras da Ortodontia, Camila Ferlim, Luciana Artioli e Priscilla Cunha, muito obrigada pela amizade, pelos conselhos, ajuda. A presença de vocês tornou esses anos da pós-graduação mais leves. Também agradeço às amigas Melyna e Marina, colegas de turma de graduação e pós, de artigos e de apoio nos sufocos. Foi maravilhoso poder conviver mais com vocês nesses anos.

Aos amigos Renan Fernandes e Diego Valentim que também auxiliaram na elaboração desse projeto. Quer sejam em etapas laboratoriais ou mesmo ajudando a entender o funcionamento do Sigma Plot.

Agradeço também a Yésselin e Kelly, que me apoiaram no projeto de Iniciação Científica. Pesquisa esta que me abriu os olhos para o mundo científico.

Aos amigos que me apoiaram em todos os momentos, sejam com palavras de conforto ou mesmo socorrendo em algum momento. Meu bondinho três lagoense, de sempre e para sempre: Fer, Rê, Mari, Carol e Ariany. Às minhas amadas Lari, Sarah, Kamila e Ludmilla e também as amigas da célula mais linda (Letícia, Mari Rente, Mayra, Juh, Milca e Paulinha) que além da amizade valorosa, me cobriram de orações e apoio em todos os momentos. Deus encha cada dia mais a vida de vocês com a presença do amado Espírito Santo.

Agradecimentos aos professores

Ao professor e orientador Osmar Aparecido Cuoghi, que me não apenas me aceitou como orientanda de TCC, mas também me desafiou a um projeto de iniciação científica que aguçou ainda mais o meu desejo pela pesquisa. Obrigada mais uma vez pela confiança, pela orientação em mais um projeto, pelos desafios propostos e por todos os ensinamentos transmitidos. Que Deus o abençoe sempre.

Ao prof. Marcos Rogério, por todos os ensinamentos e amizade, desde a graduação até a pós. Devo também ao senhor, muito do que aprendi na Ortodontia. Minha admiração pela pessoa e excelente profissional que o senhor é.

À prof. Sônia Panzarini, que alegria foi poder contar com sua ajuda na execução desse trabalho. A senhora é um exemplo de pessoa, professora e profissional para mim. Tenho uma admiração enorme desde a graduação e foi um prazer aprender e conviver um pouco mais com a senhora durante a execução desse projeto.

Ao prof. Edílson Ervolino, que não somente abriu as portas do seu laboratório e tornou possível a execução desse projeto, mas também abraçou a causa e nos ajudou tanto, nos mais diversos procedimentos experimentais. Não tenho palavras para agradecer sua disposição em encarar esse desafio com tanto profissionalismo e maestria. Obrigada!

Ao prof. Antônio Carvalho, Toninho, muito obrigada por ter sido tão prestativo quando precisamos. Por ter disponibilizado seu tempo para nos ajudar e ensinar nos trabalhos executados na radiologia.

Aos professores da banca que prontamente aceitaram meu convite: Prof. Osmar Cuoghi, Prof. Marcos Rogério e Prof. Rodrigo Sella. Muito obrigada por disporem do seu tempo e conhecimento na avaliação desse trabalho.

Agradecimentos institucionais

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA - Unesp, na pessoa do Ilustríssimo Diretor Professor Wilson Roberto Poi, pela oportunidade de realizar esse curso de Mestrado. Tenho um orgulho enorme de ser “filha dessa casa”.

À Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa do Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso e aos demais membros do conselho, pela enorme dedicação ao curso buscando sempre sua melhoria.

Ao Departamento de Odontologia Infantil e Social (FOA – UNESP), e professores da Ortodontia: André Pinheiro de Magalhães Bertoz, Marcos Rogério de Mendonça, Renato Bigliazzi e Osmar Aparecido Cuoghi, por todos os ensinamentos durante esses anos.

Aos funcionários da Disciplina de Ortodontia, Ilídio Teodoro Filho e Maria Bertolina Mesquita Oliveira, pela amizade e prontidão em atender a todos.

Às funcionárias da secretaria de pós-graduação, Valéria, Lilian e Cristiane por toda eficácia e paciência em nos atender.

Ao cursinho DACA, um dos projetos mais especiais que tive a oportunidade de participar nesta Universidade. Os quatro anos lecionando Biologia Celular, foram cruciais para a minha formação pessoal e profissional. Estendo o agradecimento em especial à profª Ana Maria Pires Soubhia, pela sábia coordenação nesse projeto. Foi um prazer enorme poder conviver um pouco mais com a senhora.

Epígrafe

“O começo de todas as ciências é o espanto das coisas serem o que são”

Aristóteles

Resumo

Faria LP. **Análise das alterações pulparem em dentes submetidos a diferentes tipos de força** [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2016.

As alterações teciduais decorrentes da movimentação dentária induzida (MDI) são constantemente estudadas, pois não estão completamente estabelecidas na literatura. Porém a maioria dos estudos descreve as alterações que a MDI provoca no periodonto e poucos em relação às alterações pulparem. O objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações pulparem após a movimentação dentária induzida com diferentes tipos de força. Ratos da linhagem Wistar foram submetidos à movimentação dentária dos primeiros molares superiores direitos com os seguintes tipos de força: força contínua (FC), força contínua interrompida (FCI) e força intermitente (FI), nos períodos de 5, 7 e 9 dias. Os incisivos superiores direitos foram submetidos à exodontia e reimplante imediato com o objetivo de induzir a anquilose para servirem de ancoragem. Foram instaladas molas de NiTi com liberação de 50cN de magnitude de força, sendo mantidas, desativadas ou removidas, em determinados períodos, para estabelecer os tipos de força sobre os molares. Os grupos foram avaliados histologicamente quanto ao padrão de celularidade, presença de alterações distróficas, hemodinâmicas e dentinárias. As alterações pulparem foram somente hemodinâmicas, como a presença de trombose, congestão vascular e hemorragias. Não houve diferença estatisticamente significantes entre os diferentes tipos de força sobre o tecido pulpar dos molares movimentados. Conclui-se que as alterações histológicas no tecido pulpar decorrentes da MDI, concentraram-se nos eventos hemodinâmicos, não progredindo para degenerações irreversíveis, independentemente do tipo de força empregada.

Palavras-chave: movimentação dentária, polpa dentária, histologia.

Abstract

Faria LP. **Analysis of pulp changes in teeth submitted to different types of force** [dissertation]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2016.

The tissue changes caused by induced tooth movement (ITM) are constantly studied, as they are not fully established in the literature. Most studies have described the reactions in the periodontium and few cases regarding pulp changes related. The aim of this study was to evaluate the pulp changes after ITM with different types of strength. Wistar rats were submitted to dental movement of the first molars rights with the following types of power: continuous force (CF), interrupted continuous force (ICF) and intermittent force (IF), in periods of 5, 7 and 9 days. The upper right incisors were subjected to extraction and reimplantation immediately with the aim of inducing ankylosis to serve as anchorage. NiTi springs were installed with release 50cN magnitude of force, being held, disabled or removed in certain periods, to establish the types of force on the molars. The groups were evaluated histologically as the pattern of cellularity, presence of dystrophic, hemodynamic and dentinal changes. Were found hemodynamic changes as the presence of thrombosis, vascular congestion and bleeding. There was no statistically significant difference between the different types of force on the pulp tissue damage. We conclude that the histological changes in the pulp tissue due was focused on hemodynamic events, not progressing to irreversible degeneration, regardless of the type of force used.

Keywords: Tooth Movement, dental pulp, histology

Lista de Figuras

Figura 1. Fotomicrografia exibindo as raízes do primeiro molar maxilar direito e sentido da força a qual o dente foi submetido.	24
Figura 2. Fotomicrografia evidenciando um padrão de celularidade e de estruturação da matriz extracelular normais e com ausência de alterações distróficas.	29
Figura 3. Alterações hemodinâmicas, evidenciando uma hemorragia (seta azul) e congestão vascular (seta laranja)	29
Figura 4. Fotomicrografia pulpar com seta evidenciando uma trombose.....	30
Figura 5. Fotomicrografia evidenciando condições de normalidade na dentina.....	30

Lista de Tabelas

Tabela 1: Distribuição dos grupos experimentais	23
Tabela 2: Frequência de fenômenos pulpares microscopicamente observados nos grupos submetidos a MDI com FC, FCI e FI.	27

Lista de Abreviaturas

FC = força contínua

FCI = força contínua interrompida

FI = força intermitente

MDI = movimentação dentária induzida

CGRP = peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

BMP = proteína morfogenética óssea

HE = hematoxilina e eosina

Sumário

1	Introdução	17
2	Proposição.....	20
3	Material e Método	22
4	Resultados	27
5	Discussão	33
6	Conclusão	37
	Referências	39
	Anexo A.....	43
	Anexo B.....	44
	Anexo C.....	48

Introdução

1 Introdução

Como consequência da movimentação ortodôntica, observam-se mudanças nos tecidos periodontais e pulpares decorrentes da exposição de forças que variam de acordo com a magnitude, frequência e duração, provocando, desta maneira, alterações macroscópicas e microscópicas¹.

Na Ortodontia, três tipos de forças podem ser empregados: forças contínuas, contínuas interrompidas e intermitentes. A força contínua (FC) é caracterizada por manter sua magnitude inicial por um período longo, fazendo uso de fios super-elásticos. Na força contínua interrompida (FCI), a magnitude inicial sofre uma queda gradativa até não ser mais capaz de produzir movimentação dentária, isso ocorre quando são utilizados os fios e molas com menor elasticidade. Já a força intermitente (FI), atua por um período relativamente curto e termina no momento em que se remove o dispositivo gerador da força, como os aparelhos removíveis e elásticos intermaxilares^{2,3}.

As alterações teciduais decorrentes da movimentação dentária induzida (MDI) em diferentes tipos de força, intensidade e duração são constantemente estudadas, pois ainda não estão completamente estabelecidas na literatura. Além disso, a maioria desses estudos descreve as reações no periodonto e poucos casos em relação às alterações pulpares⁴.

A polpa dentária é constituída por tecido conjuntivo frouxo especializado altamente diferenciado e vascularizado, apresentando grande quantidade de células, vasos sanguíneos, nervos, fibras e substâncias intercelular. Como todo tecido conjuntivo, a polpa tem elevada capacidade reparativa recuperando com facilidade desde que a colocada em condições favoráveis. Ela é derivada do mesênquima da papila dental e tem por função primordial formar dentina sendo protegida dos agentes externos pelo esmalte e por paredes da própria dentina que formada ao seu redor, caracteriza uma cavidade que a aloja. Por outro lado, essa proteção se converte em ameaça comprometendo a sua própria existência⁵.

Assim frente a qualquer agente agressor físico, químico ou bacteriano, cujos estímulos ultrapassem o limiar de tolerância fisiológica ocorrerá uma resposta inflamatória e/ou degenerativa que se caracteriza por um aumento de volume que pela própria condição morfológica vai gerar um aumento da pressão intra-pulpar⁶.

A MDI está relacionada com algumas alterações do complexo dentina–polpa como a ruptura da camada odontoblástica, alterações na microcirculação, hipóxia e calcificações pulpare^{7,8}. Dependendo do tipo, magnitude e duração da força bem como do grau de tolerância fisiológico do tecido pulpar ele pode ser alterado de forma reversível ou irreversível⁹. A extensão da lesão da polpa dentária também está correlacionada com o grau da resposta inflamatória gerada que é mediada por neuropeptídios¹⁰.

Estudos têm associado forças ortodônticas extrusivas com alguns efeitos deletérios na polpa e ligamento periodontal como estase vascular e necrose pulpar¹¹ e forças intrusivas a alterações vasculares, aumento da presença de fibrose e número de calcificações¹². Para prevenir os efeitos deletérios sobre a polpa do dente, tem sido recomendada a utilização de forças entre 50 e 100 cN em adultos¹³.

Enquanto alguns autores mostram não haver alterações pulpare decorrentes da movimentação dentária induzida^{14,15} estando os danos restritos ao periodonto¹⁴, outros autores encontraram diversos eventos, tais como: invasão de macrófagos, proliferação celular, alterações vasculares e desorganização da camada de odontoblastos^{7, 9, 10, 16-20}.

Foram relatados poucos casos de perda de vitalidade do dente durante o tratamento ortodôntico e, quando presente, estes casos estavam associados a traumas anteriores e/ou mau controle das forças ortodônticas²¹.

Uma recente revisão sistemática mostrou que as evidências científicas não suportam as correlações entre o nível de força ortodôntica e as reações pulpare⁴. Além disso, existem muitas controvérsias na literatura sobre as alterações pulpare associadas a diferentes tipos de força.

Proposição

2 Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar o tecido pulpar após a movimentação dentária induzida utilizando diferentes tipos de força quanto à sua duração.

Este estudo apresenta como hipótese nula que a MDI com diferentes tipos de força não provoca alterações pulpares.

Material e Método

3 Material e Método

3.1 Seleção e distribuição da amostra

A metodologia foi apreciada e aprovada pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Anexo A).

Foram utilizados 54 ratos machos albinos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos jovens, com aproximadamente 90 dias e com massa corporal em torno de 300g, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FOA/UNESP.

Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo de luz de 12/12 horas e temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em gaiolas com 6 animais, ração triturada e água sem restrições.

Os modelos experimentais foram compostos por 3 grupos de 18 animais, submetidos a movimentação dentária induzida (MDI) com força contínua (FC), contínua interrompida (FCI) e intermitente (FI), por períodos de 5, 7 e 9 dias. Os grupos foram subdivididos e identificados respectivamente como FC5, FC7, FC9, FCI5, FCI7, FCI9, FI5, FI7, FI9, com 6 animais em cada.

3.2 Instalação e ativação dos dispositivos para MDI

Para movimentação dos primeiros molares, foi utilizado 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, que foi previamente submetido ao processo de anquilose, de acordo com a metodologia descrita por Cuoghi²².

Para a instalação das molas, o primeiro molar superior direito foi envolvido com um fio de aço de 0,20mm de diâmetro (Morelli, Sorocaba, SP, Brasil), atado à mola de secção fechada de 3mm de comprimento, que libera uma força contínua com magnitude de 50cN. A mola, distendida 3mm em seu comprimento, foi amarrada na região cervical à resina inserida na coroa do incisivo superior direito com fio de aço de 0,25mm de diâmetro (Morelli, Sorocaba, SP, Brasil), estabelecendo assim, uma força contínua²⁹.

Para obtenção da força contínua interrompida, as molas foram passaram por períodos de ativação e contenção (a mola permanecia passiva) e para obtenção da força intermitente, as molas passaram por períodos de ativação e remoção²⁹.

A distribuição dos grupos experimentais com as forças empregadas e os tempos avaliados estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição dos grupos experimentais

Dia/Força	Dia 1	Dia 3	Dia 5	Dia 7	Dia 9
FC5	Ativação		Eutanásia		
FC7	Ativação			Eutanásia	
FC9	Ativação				Eutanásia
FCI5	Ativação	Contenção	Eutanásia		
FCI7	Ativação	Contenção	Ativação	Eutanásia	
FCI9	Ativação	Contenção	Ativação	Contenção	Eutanásia
FI5	Ativação	Remoção	Eutanásia		
FI7	Ativação	Remoção	Ativação	Eutanásia	
FI9	Ativação	Remoção	Ativação	Remoção	Eutanásia

3.3 Eutanásia e obtenção das amostras

A eutanásia ocorreu após os períodos de 5, 7 e 9 dias, por meio de dose excessiva de anestésico e, em seguida, os animais foram decapitados, preservando toda a maxila desde os incisivos até os terceiros molares. As peças foram fixadas em formol 10% por 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em solução de E.D.T.A. a 18% por 6 semanas, desidratadas, clarificadas e incluídas em blocos de parafina. Foram realizados cortes no sentido transversal, com 6µm de espessura, ao nível cervical dos molares até os incisivos, a partir da separação de todas as raízes, e corados com hematoxilina e eosina (HE).

3.4 Análise histológica

Foram capturadas imagens da área descrita acima nas maxilas utilizando uma câmera digital (JVC TK-1270 Color Vídeo Câmera) acoplada ao microscópio óptico (Axiolab, Carl

Zeiss) e conectada a um microcomputador. A polpa das cinco raízes do primeiro molar direito (Figura 1) foram avaliadas seguindo uma adaptação do método proposto por Massaro¹⁵ quanto à presença ou ausência dos seguintes fenômenos:

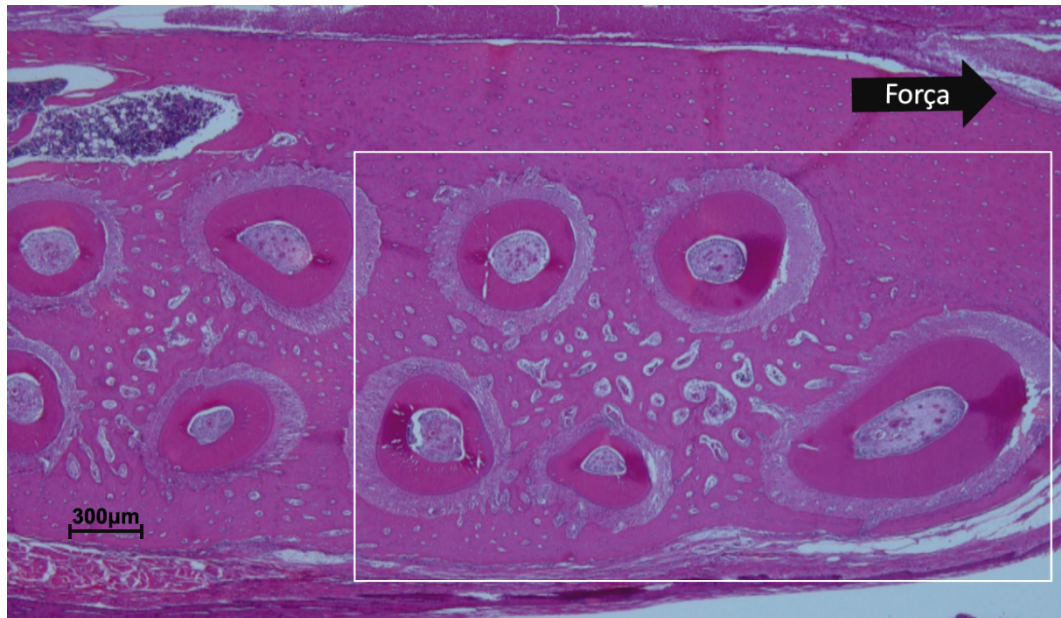


Figura 1. Fotomicrografia exibindo as raízes do primeiro molar maxilar direito e sentido da força a qual o dente foi submetido.

- Infiltrado inflamatório
- Celularidade reduzida
- Fibrosamento aumentado
- Hialinização pulpar
- Nódulos pulpare
- Calcificação difusa
- Necrose
- Congestão vascular
- Hemorragia
- Trombose
- Dentina reacional
- Túbulos com núcleos

3.5 Erro do método

Após 30 dias da primeira avaliação histológica, foram sorteadas 10% da amostra (n=6) utilizando planilhas do Excel e refeitas as avaliações. Os resultados obtidos da primeira e segunda avaliação foram submetidos ao teste Kappa, para análise da calibração intra-examinador. O índice Kappa foi de 0,637 demonstrando um bom nível de concordância.

3.6 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa Sigma Plot (Systat Software Inc., USA) e foram submetidos à análise de variância pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis executado ao nível de significância a 5% ($p < 0.05$).

Resultados

4 Resultados

As alterações pulpares estudadas foram agrupadas em quatro categorias: padrão de celularidade, presença de alterações distróficas, hemodinâmicas e dentinárias.

Tabela 2: Frequência de fenômenos pulpares microscopicamente observados nos grupos submetidos a MDI com FC, FCI e FI.

Alterações pulpares	FC			FCI			FI		
	FC5	FC7	FC9	FCI5	FCI7	FCI9	FI5	FI7	FI9
Padrão de celularidade									
Infiltrado inflamatório	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Celularidade reduzida	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrosamento aumentado	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alterações distróficas									
Hialinização	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nódulos pulpares	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Calcificação difusa	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrose	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alterações hemodinâmicas									
Congestão vascular	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Hemorragia	6	4	5	5	4	3	6	6	4
Trombose	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Alterações dentinárias									
Dentina reacional	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Túbulos com núcleos	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*Em todos os grupos experimentais n = 6.

4.1 Padrão de celularidade

O padrão de celularidade e de estruturação da matriz extracelular se mantiveram inalterados em todos os grupos e períodos estudados, com ausência de infiltrado inflamatório. As células inflamatórias encontradas estavam dentro do padrão de normalidade (Figura 2).

4.2 Alterações distróficas

Alterações distróficas como presença de hialinização, necrose, calcificação difusa e nódulos pulpare, não foram observadas em nenhum dos grupos nos períodos estudados (Figura 2).

4.3 Alterações hemodinâmicas

Foi observada a presença de congestão vascular e trombose de forma semelhante em todos os animais estudados. A hemorragia foi mais frequente ao 1º dia de MDI nos três grupos de força estudado, e com menor frequência no grupo movimentado com FCI ao 9º dia (Figuras 3 e 4).

4.4 Alterações dentinárias

Alterações dentinárias como a presença de túbulos com núcleos e formação de dentina reacional não foram observadas em nenhum dos grupos e períodos estudados. A dentina apresentava-se em condições de normalidade (Figura 5).

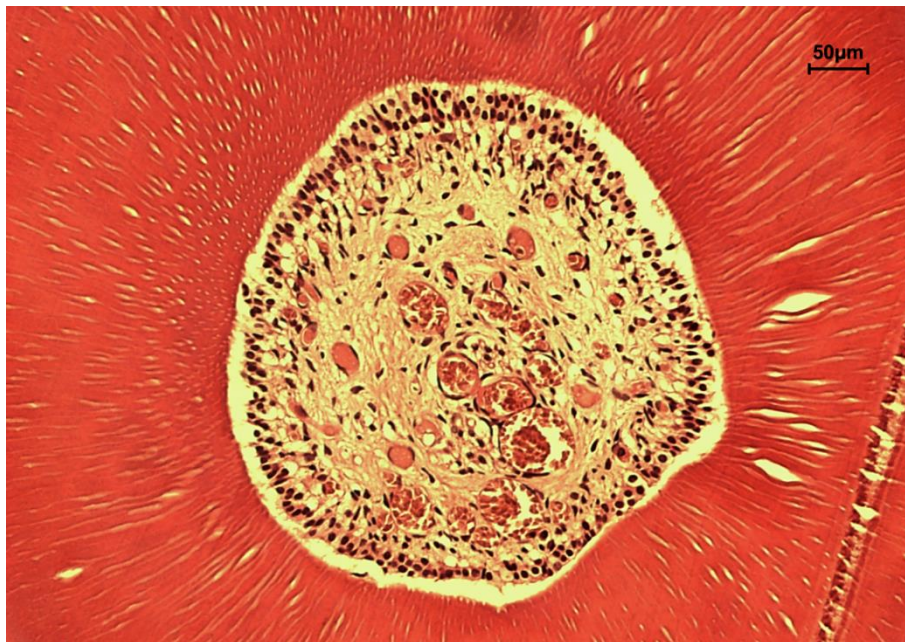


Figura 2. Fotomicrografia evidenciando um padrão de celularidade e de estruturação da matriz extracelular normais e com ausência de alterações distróficas.



Figura 3. Alterações hemodinâmicas, evidenciando uma hemorragia (seta azul) e congestão vascular (seta laranja)

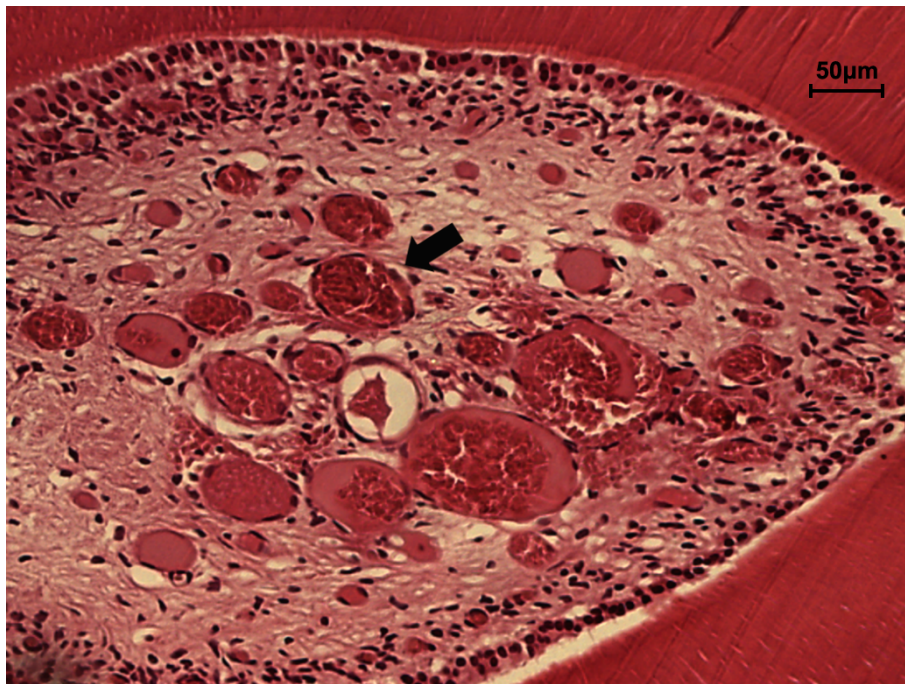


Figura 4. Fotomicrografia pulpar com seta evidenciando uma trombose

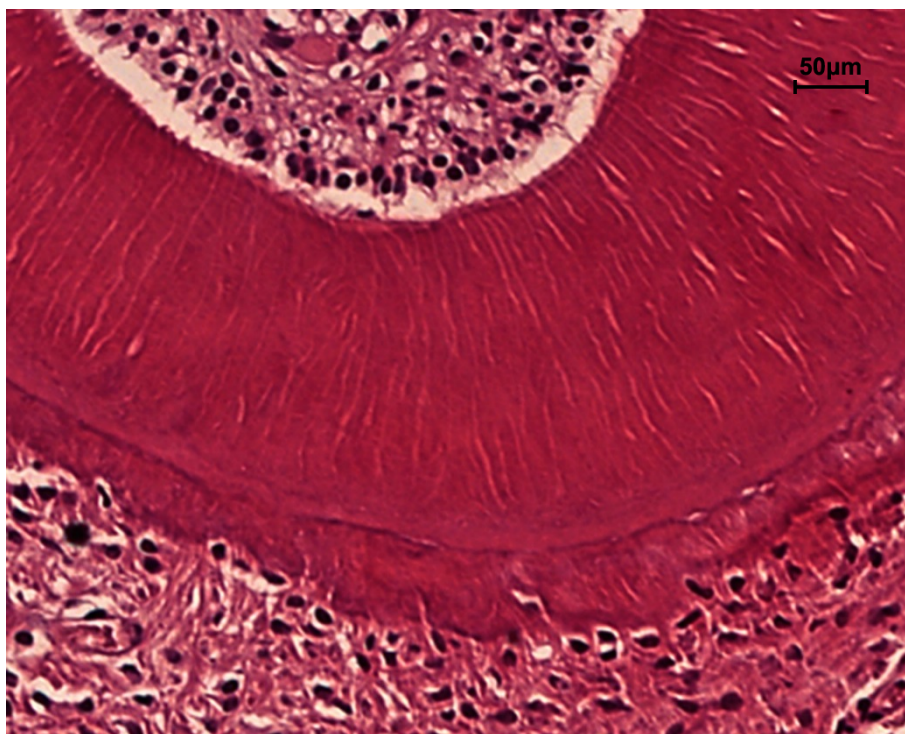


Figura 5. Fotomicrografia evidenciando condições de normalidade na dentina.

4.5 Análise estatística

Como somente foram observadas alterações hemodinâmicas, elas foram avaliadas estatisticamente pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk e análise de variância pelo teste de Kruskal-Wallis. Não houveram diferenças significantes (congestão vascular [$p = 1.000$], hemorragia [$p = 0.305$], trombose [$p = 1.000$]) entre os grupos nos diferentes tipos de força e duração da MDI.

Discussão

5 Discussão

A hipótese nula foi rejeitada, uma vez que a MDI com diferentes tipos de força foi capaz de provocar alterações pulpare.

A lesão pulpar seguida da MDI tem sido classificada como lesão temporária suave, por não produzir necrose ou abscesso, mas ser capaz de gerar reação inflamatória²³. Este processo parece ser similar ao encontrado em humanos durante a movimentação ortodôntica quando forças pesadas (ou intensas) são utilizadas¹⁶.

Alterações vasculares na polpa foram relacionadas à MDI¹⁶⁻¹⁸ e podem ser desencadeadas por neuropeptídeos, que por sua vez, são definidos como neurotransmissores ou neuromoduladores²⁴. Alguns desses neuropeptídeos podem desencadear a vasodilatação, extravasamento do plasma, ativação do sistema imune, quimiotaxia e o recrutamento e/ou regulação das células inflamatórias, tais como macrófagos, mastócitos e linfócitos¹⁰.

Neuropeptídeos tais como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) pode ser desencadeado por cárie, traumas, e também pela ação das forças ortodônticas. O CGRP aumenta a expressão de proteína morfogenética óssea (BMP) em células da polpa humanas, estimulando odontoblastos a aumentarem a deposição de dentina como um mecanismo de defesa. Este evento juntamente com a hipóxia induz o tecido pulpar a uma calcificação degenerativa podendo causar inclusive a obliteração dos canais radiculares^{7,19,20}.

Neste estudo, no entanto, não foram observadas alterações dentinárias, seja quanto à deposição de dentina reacional ou mesmo na sua estruturação, bem como a presença de calcificações no interior do tecido pulpar.

Já as forças suaves podem causar uma pequena liberação do CGRP, levando a uma congestão vascular inicial. Esse evento hemodinâmico foi observado com frequência em todos os grupos, não havendo diferenças significantes entre os diferentes tipos de força a que os animais foram submetidos. Contudo, a congestão vascular pode ser

compensada por um sistema de liberação de fatores angiogênicos, impedindo que ocorram danos irreversíveis à polpa²⁵⁻²⁷.

Foram encontrados neste estudo, e em alto número, alterações hemodinâmicas como a presença de vasos congestos e trombóticos e algumas áreas de hemorragia. Esses eventos podem acontecer em razão de alterações na microcirculação na polpa, que elevam a pressão do tecido⁹, podendo inclusive levar a um rompimento do epitélio do vaso, produzindo hemorragias.

Dentre as possíveis consequências das alterações hemodinâmicas, está a necrose, que é o resultado final, e mais indesejado, da inflamação na polpa (pulpite irreversível). Esta necrose (por coagulação) pode ocorrer em decorrência da falta de suprimento sanguíneo em um tecido, como consequência de um trombo ou rompimento de vasos^{5,6}.

Santamaria et al.¹⁸, avaliando alterações pulpares nos períodos de 6, 12, 24 e 72 horas após a MDI, também não observaram nenhum caso de necrose, sugerindo então que as alterações pulpares decorrentes da MDI no tecido indicavam uma pulpite reversível, quadro similar ao observado nesta pesquisa.

Polpas mais jovens são mais amplas, com pouco fibrosamento e grande quantidade de células. Esse padrão vai se alterando com o passar do tempo, sendo que ocorre uma redução da câmara pulpar (pela deposição de dentina secundária e/ou reacional), aumento do fibrosamento e da densidade celular além de redução da quantidade de vasos sanguíneos^{5,6}. Essa pode ser uma hipótese para explicar a pequena alteração pulpar verificada nesse experimento, porque os animais eram jovens e a polpa dental nessa condição apresenta uma maior capacidade de resposta às variações ambientais como os traumas e ação de forças ortodônticas.

Ainda em relação à idade da polpa, os nódulos e as calcificações pulpares fazem parte do processo de envelhecimento natural da polpa, porém podem ocorrer precocemente quando há a ação de processos traumáticos sobre a estrutural dentária. Esses eventos não foram observados nos grupos estudados, sugerindo que além da idade dos animais, a intensidade, tipo e duração das forças ortodônticas utilizadas nestes animais não foram suficientes para produzir essas alterações distróficas.

A revisão sistemática de Von Böhl et al.⁴, destaca quatro fatores importantes que explicam as dificuldades de se obter conclusões cientificamente fortes sobre a ação da MDI sobre a polpa dentária, e são elas: a pequena quantidade de estudos randomizados, diferentes tipos de forças estudados (intrusivas, extrusivas e de inclinação), diversas intensidades de força (entre 25 a 4400cN) além de grande variedade de duração (25 segundos a 152 dias). Além disso nas últimas duas revisões sistemáticas sobre o tema, somente foram incluídos estudos com forças de inclinação, intrusão e extrusão, não havendo comparação entre as FC, FCI e FI⁴⁻²⁸.

Frequentemente observa-se a realização de tratamentos ortodônticos com dispositivos que desempenham forças contínuas, sem interrupção durante todo o período. Mesmo com forças de baixa magnitude, os efeitos deletérios podem ocorrer com maior frequência, seja pela variedade anatômica óssea, dentária e periodontal de cada indivíduo, além do estresse permanecer atuando durante um longo período no ligamento periodontal.

Cuoghi et al.²⁹ estudaram os efeitos das FC, FCI e FI em ratos, e encontraram maiores reabsorções radiculares associadas à FC, corroborando o fato de que a duração e as características da força têm grande influência no mecanismo biológico, podendo promover diferentes reações teciduais¹.

Massaro et al.¹⁵ também estudaram MDI com força contínua e observaram maior reabsorção radicular ao 7º dia de MDI com força contínua, porém sem maiores danos pulpare. Mais estudos necessitam ser realizados para observar se a reabsorção radicular pode estar associada a alterações pulpare em períodos mais tardios da movimentação dentária.

Partindo do princípio de que são os estímulos biológicos que promovem a movimentação dentária³⁰⁻³¹ apesar serem utilizados dispositivos que exercem forças mecânicas, é importante estudar e observar com atenção todas as alterações teciduais decorrentes da MDI. Somente assim, poderão ser definidas as melhores condutas frente a um planejamento ortodôntico, com melhor embasamento e evidências científicas.

Conclusão

6 Conclusão

As alterações pulparem após a MDI, concentraram-se nos eventos hemodinâmicos, sem diferenças entre os grupos estudados independentemente do tipo e duração da força empregada, não progredindo para degenerações irreversíveis.

Referências

Referências

1. Krishnan V, Davidovich Z. Cellular, molecular and tissue-level reactions to orthodontic forces. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006; 129:469.e1–32.
2. Graber TM, Vanarsdall Jr RL, editors. *Ortodontia: princípios e técnicas atuais*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
3. Proffit WR, Fields Jr HW. *Contemporary orthodontics*. 2. ed. St. Louis: Mosby; 1993
4. Von Böhl M, Ren Y, Fudalej PS, Kuijpers-Jagtman AM. Pulpal reactions to orthodontic force application in humans: a systematic review. *J Endod*. 2012 Nov;38(11):1463-9.
5. Leonardo, MR. *Endodontia. Tratamento de canais radiculares – princípios técnicos e biológicos*. Artes Médicas, São Paulo, 2005.
6. Estrela, C. *Ciência Endodôntica*. 1ª ed., Artes Médicas, 2004.
7. Unsterseher RE, Nieberg LG, Weimer AD, Dyer JK. The response of human pulpal tissue after orthodontic force application. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1987;92:220–4.
8. Kindelan SA, Day PF, Kindelan JD, Spencer JR, Duggal MS. Dental trauma: an overview of its influence on the management of orthodontic treatment. Part 1. *J Orthod* 2008;35:68–78.
9. Vandevska-Radunovic V, Kvinnsland S, Kvinnsland IH. 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. *Eur J Orthod* 1997;19:517–29.
10. Caviedes-Bucheli J, Munoz HR, Azuero-Holguin MM, Ulate E. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. *J Endod* 2008;34:773–88.

11. Roberts WE, Goodwin WC Jr, Heiner SR. Cellular response to orthodontic force. *Dent Clin North Am* 1981;25:3–17.
12. Lazzaretti DN, Bortoluzzi GS, Torres Fernandes LF, Rodriguez R, Grehs RA, Martins Hartmann MS. Histologic evaluation of human pulp tissue after orthodontic intrusion. *J Endod*. 2014 Oct;40(10):1537-40.
13. Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Optimum force magnitude for orthodontic tooth movement: a systematic literature review. *Angle Orthod* 2003;73:86–92.
14. Tripuwabhrut P, Brudvik P, Fristad I, Rethnam S. Experimental orthodontic tooth movement and extensive root resorption: periodontal and pulpal changes. *Eur J Oral Sci* 2010; 118: 596–603.
15. Massaro CS, Consolaro RB, Santamaria M Jr, Consolaro MF, Consolaro A. Analysis of the dentin-pulp complex in teeth submitted to orthodontic movement in rats. *J Appl Oral Sci*. 2009;17 Suppl:35-42.
16. Grünheid T, Morbach BA, Zentner A. Pulpal cellular reactions to experimental tooth movement in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Sep;104(3):434-41.
17. Mostafa YA, Iskander KG, El-Mangoury NH. Iatrogenic pulpal reactions to orthodontic extrusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1991 Jan;99(1):30-4.
18. Santamaria M Jr, Milagres D, Iyomasa MM, Stuari MB, Ruellas AC. Initial pulp changes during orthodontic movement: histomorphological evaluation. *Braz Dent J*. 2007;18(1):34-9.
19. Trantor IR, Messer HH, Bimer R. The effects of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide and substance P) on culture human pulp cells. *J Dent Res* 1995;74:1066–71.
20. Calland JW, Harris SE, Carnes DL. Human pulp cells respond to calcitonin gene-related peptide in vitro. *J Endod* 1997;23:485–9
21. Yamaguchi M, Kasai K. The Effects of Orthodontic Mechanics on the Dental Pulp. *Semin Orthod* 2007;13:272-280.
22. Cuoghi OA, Tondelli PM, Sonoda CK, Aiello CA, de Mendonça MR, Costa SC. Induction of ankylosis in the incisor for orthodontic tooth movement in rats. *Dent Traumatol*. 2014 Apr;30(2):112-7.

23. Byers MR, Närhi MVO. Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:4-39.
24. Hoyle CHV. *Neuropeptides, essential data*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1995.
25. Derringer KA, Jagers DC, Linden RW. Angiogenesis in human dental pulp following orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 1996;75:1761–76.
26. El Karim IA, Linden GJ, Irwin CR, Lundy FT. Neuropeptides regulate expression of angiogenic growth factors in human dental pulp fibroblasts. *J Endod* 2009;35:829–33.
27. Caviedes-Bucheli J, Moreno JO, Ardila-Pinto J, Toro-Carreno HRD, Hernando Quintero HS, Sierra-Tapias CL, Macias-Gomez F, Ulate R, Lombana-Sanchez N, Munoz HR. The Effect of Orthodontic Forces on Calcitonin Gene-related Peptide Expression in Human Dental Pulp. *J Endod* 2011;37:934–937.
28. Javed F, Al-Kheraif AA, Romanos EB, Romanos GE. Influence of orthodontic forces on human dental pulp: a systematic review. *Arch Oral Biol*. 2015 Feb;60(2):347-56.
29. 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.
30. Consolaro A. *Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas*. 2 ed. Maringá: Dental Press; 2005.
31. Baumrind S, Buck DL. Rate changes in cell replication and protein synthesis in the periodontal ligament incident to tooth movement. *Am J Orthod* 1970;57:109-31.

Anexos

Anexo A



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 "**Análise das alterações pulpares em dentes submetidos a diferentes tipos de força**", Processo FOA nº 01247-2015, sob responsabilidade de Osmar Aparecido Cuoghi apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 17 de Fevereiro de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 14 de Setembro de 2016.

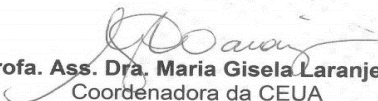
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 14 de Outubro de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Analysis of the pulp changes in teeth subjected to different types of force**", Protocol FOA nº 01247-2015, under the supervision of Osmar Aparecido Cuoghi presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on February 17, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: September 14, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: October 14, 2016.


Profa. Ass. 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 B

Erro do método

Teste Kappa - SPSS

Tabulações cruzadas

Observações		
Saída criada		28-JUN-2016 10:07:59
Comentários		
Entrada	Conjunto de dados ativo	Conjunto_de_dados1
	Filtro	<none>
	Ponderação	<none>
	Arquivo Dividido	<none>
	N de linhas em arquivo de dados de trabalho	18
Tratamento de valor ausente	Definição de ausente	Os valores ausentes definidos pelo usuário são tratados como ausentes.
	Casos utilizados	As estatísticas de cada tabela são baseadas em todos os casos com dados válidos no(s) intervalo(s) especificado(s) para todas as variáveis de cada tabela.
Sintaxe		CROSSTABS /TABLES=VAR00001 BY VAR00002 /FORMAT=AVALUE TABLES /STATISTICS=KAPPA /CELLS=COUNT /COUNT ROUND CELL.
Recursos	Tempo do processador	00:00:00.02
	Tempo decorrido	00:00:00.41
	Dimensões solicitadas	2
	Células disponíveis	131029

[Conjunto_de_dados1]

Resumo de processamento do caso

	Casos				
	Válido		Ausente		Total
	N	Porcentagem	N	Porcentagem	N
VAR00001 * VAR00002	18	100,0%	0	0,0%	18

Resumo de processamento do caso

	Casos
	Total
	Porcentagem
VAR00001 * VAR00002	100,0%

VAR00001 * VAR00002 Tabulação cruzada

Contagem

		VAR00002						Total
		,00	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00	
VAR00001	,00	1	0	0	0	0	0	1
	1,00	0	1	0	0	0	0	1
	2,00	0	0	2	0	0	0	2
	3,00	0	0	2	1	0	0	3
	4,00	0	0	0	1	2	0	3
	5,00	0	0	0	1	1	6	8
Total		1	1	4	3	3	6	18

Medidas Simétricas

		Valor	Significância Erro Padrão ^a	Aprox. χ^b	Aprox. Sig.
Medida de concordância	Kappa	,637	,134	5,398	,000
N de Casos Válidos		18			

a. Não considerando a hipótese nula.

b. Uso de erro padrão assintótico considerando a hipótese nula.

Análise estatística

1) Congestão Vascular

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed ($P < 0.050$)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
fc5	6	0	1.000	1.000	1.000
fc7	6	0	1.000	1.000	1.000
fc9	6	0	1.000	1.000	1.000
fci5	6	0	1.000	1.000	1.000
fci7	6	0	1.000	1.000	1.000
fci9	6	0	1.000	1.000	1.000
fi5	6	0	1.000	1.000	1.000
fi7	6	0	1.000	1.000	1.000
fi9	6	0	1.000	1.000	1.000

$H = 0.000$ with 8 degrees of freedom. ($P = 1.000$)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 1.000$)

2) Hemorragia

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed ($P < 0.050$)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
fc5	6	0	1.000	1.000	1.000
fc7	6	0	1.000	0.000	1.000
fc9	6	0	1.000	0.000	1.000
fci5	6	0	1.000	0.750	1.000
fci7	6	0	1.000	0.000	1.000
fci9	6	0	0.500	0.000	1.000
fi5	6	0	1.000	1.000	1.000
fi7	6	0	1.000	1.000	1.000
fi9	6	0	1.000	0.000	1.000

$H = 9.464$ with 8 degrees of freedom. ($P = 0.305$)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.305)

3) Trombose

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed (P < 0.050)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
fc5	6	0	1.000	1.000	1.000
fc7	6	0	1.000	1.000	1.000
fc9	6	0	1.000	1.000	1.000
fci5	6	0	1.000	1.000	1.000
fci7	6	0	1.000	1.000	1.000
fci9	6	0	1.000	1.000	1.000
fi5	6	0	1.000	1.000	1.000
fi7	6	0	1.000	1.000	1.000
fi9	6	0	1.000	1.000	1.000

H = 0.000 with 8 degrees of freedom. (P = 1.000)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 1.000)

Anexo C



Information for contributors

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 * $P=.05$; ** $P=.01$; *** $P=.001$; **** $P=.0001$ 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.