

Francielle Topolski

Avaliação da correlação entre dor e reações teciduais indesejadas da movimentação dentária induzida por diferentes tipos de força: estudo histomorfométrico, imunoistoquímico e comportamental

**Araçatuba – SP
2016**

Francielle Topolski

Avaliação da correlação entre dor e reações teciduais indesejadas da movimentação dentária induzida por diferentes tipos de força: estudo histomorfométrico, imunoistoquímico e comportamental

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

Orientador: Prof. Dr. Osmar Aparecido Cuoghi
Coorientador: Prof. Dr. Edilson Ervolino

Araçatuba – SP

2016

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

T675a Topolski, Francielle.
Avaliação da correlação entre dor e reações teciduais indesejadas da movimentação dentária induzida por diferentes tipos de força : estudo histomorfométrico, imunoistoquímico e comportamental / Francielle Topolski. - Araçatuba, 2016
54 f. : il ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Osmar Aparecido Cuoghi
Coorientador: Prof. Edilson Ervolino

1. Ortodontia 2. Movimentação dentária 3. Dor 4. Ratos Wistar 5. Comportamento I. T.

Black D4
CDD 617.643

DEDICATÓRIA

À minha mãe Dejeni, pelos valores transmitidos, por todos os esforços empreendidos para a minha formação, pelo amor incondicional, por acreditar e querer sempre o melhor para mim, por tudo que sou e por ser sempre o meu porto seguro.

Ao meu esposo Sidarta, pelo companheirismo em todos esses anos em que estamos juntos, por dividir os sonhos, as lutas, as tristezas e alegrias, as dificuldades e as conquistas; por ser o meu melhor amigo; pelo incentivo e apoio fundamentais para a concretização desta etapa da minha vida; pela compreensão nos momentos de ausência e pelo amor em todas as horas.

À minha filha Isadora, por dar significado a tudo que fiz e a tudo que ainda irei fazer, e por trazer mais vida para a minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, por todas as bênçãos em minha vida, por mais este sonho realizado e também por todas as dificuldades do caminho, pois foram nelas que estiveram as maiores oportunidades de crescimento e evolução. Agradeço pela força e pela coragem para enfrentar esses desafios.

Aos meus avós João e Herminia (in memoriam), pelo carinho que só os avós são capazes de dar, por serem um exemplo de vida para toda a nossa família, e porque as suas lutas no passado abriram caminho para que hoje eu pudesse estar realizando este sonho.

A toda a minha família. Alguns acompanharam mais de perto esta caminhada, percebendo as suas dificuldades e também a satisfação que me trazia: meus primos Mariana e Maicon, meus sogros Josefa e Celso, meus cunhados Bruno, Herman e Michael. À minha tia Neiva, presença constante em toda minha vida e ao meu tio Airton que, sempre carinhoso, honesto e bondoso, além de ser um exemplo de vida me inspirou a seguir a Odontologia. E a todos os meus tios e primos, pois tenho certeza que mesmo mais distantes sempre torceram por mim e desejaram que eu tivesse sucesso na busca pelos meus sonhos. Sou feliz porque tenho vocês!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Osmar Aparecido Cuoghi, por me aceitar no programa de pós-graduação, por confiar em mim e me apoiar na realização deste trabalho, pelo conhecimento compartilhado e pela amizade construída ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Edilson Ervolino, pela disponibilidade em participar deste trabalho e pelas valiosas contribuições, essenciais para a sua concretização, pelo apoio e pelo conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr. Marcos Rogério de Mendonça, pela acolhida nos primeiros dias, por deixar sempre as portas abertas para todos, pelos ensinamentos transmitidos e pela amizade.

Aos professores da Disciplina de Ortodontia, Prof. André Pinheiro de Magalhães Bertoz e Prof. Renato Bigliazzi, pelos momentos de convivência, amizade e aprendizado.

Aos funcionários da Disciplina de Ortodontia, Ilídio Teodoro Filho (Lidinho), Maria Bertolina Mesquita de Oliveira (Berta) e Luiz Carlos dos Santos (Luizinho), por sempre estarem prontos a me auxiliar, pela convivência agradável e pelo carinho com que sempre me trataram.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas, Profa. Roberta Okamoto, Profa. Mariza Akemi Matsumoto, Prof. Paulo Roberto Botacin, Prof. Roelf Justino Cruz Rizzolo, Profa. Alaíde Gonçalves, Prof. Cláudio Aparecido Casatti e Prof. José Américo de Oliveira, pela acolhida no departamento, pela ajuda sempre que precisei e pelas conversas que tornaram o dia a dia tão agradável.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Básicas, Eliseide Maria Ferreira Silva Navega, André Luís Mattos Piedade e Arnaldo César dos Santos, pelo auxílio em tantos momentos.

Às funcionárias da secretaria da pós-graduação, Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto, Lilian Sayuri Mada e Cristiane Regina Lui Matos, pela competência com que realizam o seu trabalho, contribuindo assim para o sucesso desta pós-graduação.

Aos funcionários da biblioteca, por terem sido sempre tão atenciosos.

Ao doutorando Diego Valentim, pela disponibilidade, comprometimento e valiosa contribuição para a realização desta pesquisa.

Aos colegas e amigos Ana Caroline Gonçalves Verri e Éverton Ribeiro Lelis, pela convivência agradável, pelo incentivo e pelos conhecimentos compartilhados.

Às colegas e amigas Kelly Regina Micheletti e Yésselin Margot Miranda-Zamalloa, por auxiliarem na realização deste trabalho de pesquisa, por compartilharem conhecimentos, por me acolherem e apoiarem.

Às companheiras de luta, Luciana Artioli Costa, Camila Ribeiro Ferlin e Priscilla Cunha Santos Andrade, por compartilharem angústias, dificuldades, alegrias, sonhos e realizações; pelas conversas que confortaram, fortaleceram e alegraram; pelos momentos de descontração que coloriram esta caminhada e amenizaram a distância de casa; pela amizade tão importante durante toda esta jornada.

À colega e amiga Lorraine Perciliano de Faria, pela participação fundamental para a concretização deste trabalho de pesquisa; pelo apoio, pela ajuda em tantos momentos; por me apresentar a FOA; por me contagiar com a sua fé, leveza e bom humor inabaláveis.

À amiga Marta Aparecida Alberton Nuernberg, que apareceu no finalzinho, trazendo boas energias, convivência harmônica e alegre.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp, por possibilitar o meu crescimento profissional.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a concretização desta etapa da minha vida.

“Ninguém pode construir em teu lugar as pontes que precisarás passar, para atravessar o rio da vida – ninguém, exceto tu, só tu.

Existem, por certo, atalhos sem números, e pontes, e semi-deuses que se oferecerão para levar-te além do rio; mas isso te custaria a tua própria pessoa; tu te hipotecarias e te perderias. Existe no mundo um único caminho por onde só tu podes passar. Onde leva? Não perguntes, segue-o.”

Friedrich Wilhelm Nietzsche

TOPOLSKI, F. Avaliação da correlação entre dor e reações teciduais indesejadas da movimentação dentária induzida por diferentes tipos de força: estudo histomorfométrico, imunoistoquímico e comportamental [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a correlação entre dor e reações teciduais indesejadas da movimentação dentária induzida (MDI). Verificou-se a correlação entre hialinização no ligamento periodontal (LP) de ratos submetidos à MDI por força contínua (FC) e força contínua interrompida (FCI) e dor, avaliada por meio da presença de mediadores químicos associados à nocicepção – ciclooxygenase-2 (COX-2) e interleucina-1 beta (IL-1 β) – no LP e pelo comportamento dos animais. Foram utilizados 42 ratos machos (Wistar, *Rattus norvegicus*), com aproximadamente 90 dias e 300g de massa corporal, divididos em 7 grupos de 6 animais: 1 grupo controle e 6 grupos submetidos à MDI por FC e FCI por 1, 3 e 5 dias. Após 7 dias de ambientação, os animais foram submetidos à indução de anquilose do incisivo superior direito e após 14 dias à instalação de dispositivo para MDI. A força aplicada foi de 50cN. Os grupos submetidos à FCI tiveram o dispositivo desativado e reativado durante os períodos experimentais. Foram realizados vídeos para obtenção dos dados comportamentais ao final dos períodos experimentais. A análise histomorfométrica foi utilizada para avaliação da hialinização. A presença de COX-2 e IL-1 β foi avaliada por meio de análise imunoistoquímica. Os seguintes comportamentos foram avaliados: Andando, Escalando, Postura Imóvel, Descansando/Dormindo e *Directed Face Grooming*. Houve correlação positiva moderada entre hialinização e presença de COX-2 ($r_s = 0,404$, $p < 0,05$) e IL-1 β ($r_s = 0,429$, $p < 0,05$). Também houve correlação negativa moderada entre hialinização e comportamentos exploratórios (Andando, $r = -0,586$, $p < 0,01$; Escalando, $r = -0,573$, $p < 0,01$) e correlação positiva moderada entre hialinização e o comportamento Descansando/Dormindo ($r = 0,467$, $p < 0,01$). Os resultados sugerem que existe correlação entre dor e reações teciduais indesejadas da MDI.

Palavras-chave: Ortodontia. Movimentação dentária. Dor. Ratos Wistar. Comportamento.

TOPOLSKI, F. Evaluation of the correlation between pain and unwanted tissue reactions of induced tooth movement by different types of force: a histomorphometric, immunohistochemical and behavioral study [thesis]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2016.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the correlation between pain and unwanted tissue reactions in response to induced tooth movement (ITM). For this purpose, the correlation between hyalinization in periodontal ligament (PL) of rats submitted to ITM by continuous force (CF) and interrupted continuous force (ICF) and pain was evaluated. Pain was assessed by the presence of chemical mediators associated with nociception – cyclooxygenase-2 (COX-2) and interleukin-1 beta (IL-1 β) – in the PL and animals' behavior. Forty-two rats (Wistar, *Rattus norvegicus*) with approximately 90 days and 300g of body weight were used. The animals were divided into 7 groups of 6 animals each: control group and 6 groups submitted to ITM by CF and ICF for 1, 3 and 5 days. After 7 days of habituation the animals underwent ankylosis induction of right upper incisor and after 14 days to installation of the device for ITM. A force of 50cN was applied. The groups submitted to ICF had the device deactivated and reactivated during the experimental periods. Videos were taken to obtain the behavioral data at the end of experimental periods. Histomorphometric analysis was used to evaluate the hyalinization. The presence of COX-2 and IL-1 β was assessed by immunohistochemical analysis. The following behaviors were assessed: Walking, Climbing, Immobile Posture, Resting/Sleeping and Directed Face Grooming. There was a moderate positive correlation between hyalinization and COX-2 ($r_s = 0.404$, $p < 0.05$) and IL-1 β ($r_s = 0.429$, $p < 0.05$). There was also moderate negative correlation between hyalinization and exploratory behavior (Walking, $r = -0.586$, $p < 0.01$; Climbing, $r = -0.573$, $p < 0.01$) and moderate positive correlation between hyalinization and the behavior Resting/Sleeping ($r = 0.467$, $p < 0.01$). The results suggest that there is a correlation between pain and unwanted tissue reactions of ITM.

Keywords: Orthodontics. Tooth Movement. Pain. Rats, Wistar. Behavior.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Grupos experimentais	21
Figura 2 – Protocolo experimental.....	23
Figura 3 – Dispositivo para MDI instalado e ativado	25
Figura 4 – Análise histomorfométrica	28
Figura 5 – Correlação entre hialinização e comportamentos	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Hialinização – FMDV	31
Tabela 2 – Padrão de imunomarcacão para COX-2 e IL-1 β	32
Tabela 3 – Tempo gasto em cada comportamento (%; média $\pm$ desvio padrão)	33

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Normas para publicação (Continua)	48
Anexo B – Certificado de Aprovação da CEUA.....	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

C	Grupo Controle
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COX-2	Ciclooxigenase-2
DFG	<i>Directed face grooming</i>
DV	Distovestibular
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
FC	Força contínua
FC 1	Grupo Força Contínua 1 Dia
FC 3	Grupo Força Contínua 3 Dias
FC 5	Grupo Força Contínua 5 Dias
FCI	Força contínua interrompida
FCI 1	Grupo Força Contínua Interrompida 1 Dia
FCI 3	Grupo Força Contínua Interrompida 3 Dias
FCI 5	Grupo Força Contínua Interrompida 5 Dias
FMDV	Face mesial da raiz distovestibular
FOA/UNESP	Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
HE	Hematoxilina-eosina
IL-1 β	Interleucina-1 beta
LP	Ligamento periodontal
MDI	Movimentação dentária induzida
MV	Mesiovestibular
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	PROPOSIÇÃO	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1	Grupos experimentais	21
3.2	Protocolo experimental	22
3.2.1	Indução de anquilose.....	24
3.2.2	Movimentação dentária induzida	24
3.2.3	Obtenção dos dados comportamentais	25
3.3	Eutanásia e obtenção das amostras.....	26
3.4	Processamento histológico e imunoistoquímico	26
3.5	Análise histomorfométrica.....	27
3.6	Análise imunoistoquímica	28
3.7	Análise comportamental	29
3.8	Análise estatística	29
4	RESULTADOS	31
4.1	Erro do método	31
4.2	Hialinização.....	31
4.3	Mediadores químicos.....	32
4.4	Comportamento	33
4.5	Correlação entre hialinização e mediadores químicos.....	33
4.6	Correlação entre hialinização e comportamento.....	33
5	DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÃO.....	42
	REFERÊNCIAS.....	44
	ANEXOS	47

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃOⁱ

A movimentação dentária induzida (MDI) é resultado da aplicação de forças aos dentes, que levam à formação de áreas de compressão e de tração no ligamento periodontal (LP). Este estímulo desencadeia uma série de reações teciduais, tendo como consequência a remodelação do alvéolo por processos de reabsorção e aposição óssea, permitindo assim o deslocamento dentário.¹ A utilização de forças biologicamente adequadas permite que a MDI ocorra com um mínimo de efeitos indesejados. Por outro lado, a utilização de forças inadequadas pode levar à formação de áreas de hialinização no LP e à reabsorção radicular.¹⁻⁴

Em relação à magnitude, as forças suaves provocam menos efeitos indesejados que as forças intensas.⁴ Além disso, quanto melhor for a distribuição da força ao longo da superfície radicular, menor será o seu potencial de causar danos teciduais.⁵ Quanto à duração, as forças ortodônticas são classificadas em forças contínuas (FC – caracterizadas pela manutenção da magnitude inicial); forças contínuas interrompidas (FCI – caracterizadas pelo declínio gradativo da magnitude inicial); e forças intermitentes (FI – quando a magnitude inicial declina a zero abruptamente e retorna para seu nível original algum tempo depois, de forma intermitente).⁶ As FC parecem estar mais associadas à ocorrência de efeitos colaterais indesejados,⁷⁻⁹ haja vista que as FCI e as FI permitem o restabelecimento da espessura normal do LP ao longo da MDI. Desse modo, evitam a ocorrência de longos períodos de hipóxia e/ou anóxia, prevenindo a formação de áreas de hialinização e permitindo a reorganização das regiões hialinizadas, além de gerarem menos danos à camada de cementoblastos.¹⁰

Portanto, o controle dos efeitos indesejados da MDI está relacionado à aplicação de forças de intensidade, distribuição e duração adequadas. A aplicação de tal regime de forças, entretanto, é um grande desafio na prática clínica.^{1,11} Ainda que a literatura indique caminhos, como a utilização de forças suaves, bem distribuídas e aplicadas de forma interrompida ou intermitente,^{1-5,7-10} os meios para atingir este objetivo ainda são baseados predominantemente na experiência e habilidade do profissional,¹ já que não é possível medir de forma precisa a quantidade de estresse

ⁱ O trabalho foi elaborado de acordo com as normas do periódico *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* (Anexo A).

aplicado às diferentes regiões do LP, das estruturas ósseas e das raízes por qualquer modalidade de tratamento. Além disso, a variabilidade individual das estruturas dentárias, do LP e do osso alveolar dificulta o estabelecimento de padrões clínicos de força ideal.¹

Uma das observações que podem ser realizadas durante o tratamento ortodôntico é o relato, por parte do paciente, da percepção de dor. A dor associada à MDI é decorrente do estímulo mecânico e da reação inflamatória nas regiões de tração e compressão do LP.¹² Questiona-se, entretanto, se a dor decorrente da MDI está associada à aplicação de forças inadequadas e consequentemente à ocorrência de reações teciduais indesejadas. Buscando elucidar esta questão, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a relação entre dor e reações teciduais indesejadas da MDI. Para esta finalidade, foi verificada a correlação entre hialinização no LP de ratos submetidos à MDI por FC e FCI e dor, avaliada por meio da presença de mediadores químicos associados à nocicepção no LP e pelo comportamento dos animais.

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Este trabalho se propôs a verificar a correlação entre hialinização no ligamento periodontal (LP) de molares de ratos submetidos à movimentação dentária induzida (MDI) por força contínua e força contínua interrompida e dor, avaliada por meio da presença de mediadores químicos associados à nocicepção no LP e pelo comportamento dos animais, com o objetivo de testar a hipótese nula de que não existe correlação entre dor e reações teciduais indesejadas da MDI.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Grupos experimentais

A pesquisa foi aprovada (Processo FOA 2014-00796, Anexo B) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FOA/UNESP).

Foram utilizados 42 ratos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos jovens – com aproximadamente 90 dias – com massa corporal em torno de 300g, provenientes do Biotério da FOA/UNESP. Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo de luz de 12/12hs e temperatura de 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), em gaiolas com 4 animais cada, com acesso a ração e água sem restrições. Os animais foram divididos em 7 grupos, conforme ilustrado na Figura 1.

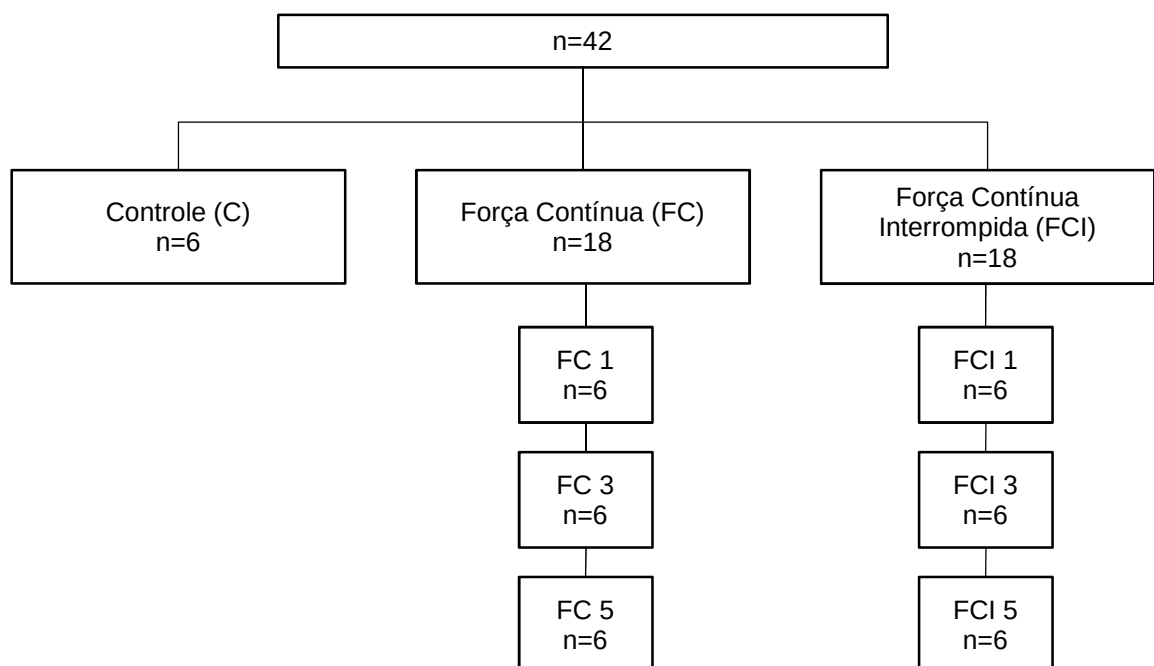


Figura 1 – Grupos experimentais

Fonte: elaboração própria.

O grupo controle (C, n=6) não foi submetido a nenhum procedimento experimental, exceto pela ambientação e pela obtenção dos dados comportamentais. Dois grupos de 18 animais foram submetidos à movimentação dentária induzida (MDI) com força contínua (FC) e força contínua interrompida (FCI) por períodos de 1, 3 e 5 dias: Grupo Força Contínua 1 Dia (FC 1, n=6), Grupo Força Contínua 3 Dias (FC 3,

n=6), Grupo Força Contínua 5 Dias (FC 5, n=6), Grupo Força Contínua Interrompida 1 Dia (FCI 1, n=6), Grupo Força Contínua Interrompida 3 Dias (FCI 3, n=6), Grupo Força Contínua Interrompida 5 Dias (FCI 5, n=6).

3.2 Protocolo experimental

O protocolo experimental incluiu as seguintes etapas: ambientação, indução de anquilose, MDI e obtenção dos dados comportamentais. Findado o protocolo experimental, os animais foram eutanasiados. Os procedimentos foram realizados sob anestesia intramuscular com cloridrato de ketamina (Dopalen®, Sespo Ind. e Com. Ltda., Jacareí, SP, Brasil) na dosagem de 80mg/Kg, concomitantemente com a aplicação de relaxante muscular cloridrato de xilazina (Anasedan®, Agribrands do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brasil) na dosagem de 10mg/Kg. As diferentes etapas do protocolo experimental podem ser visualizadas na Figura 2.

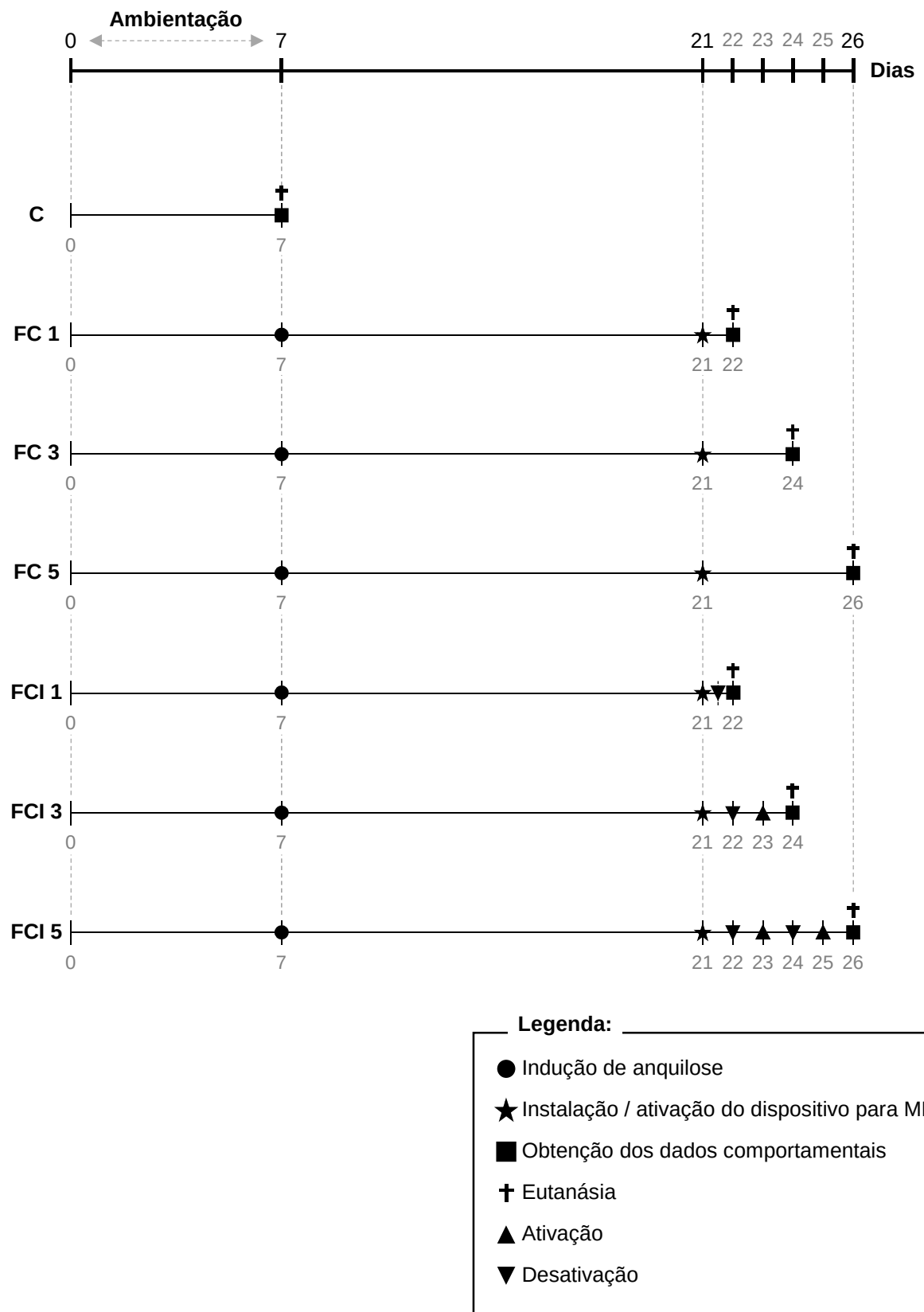


Figura 2 – Protocolo experimental
 Fonte: elaboração própria.

3.2.1 Indução de anquilose

Após um período de ambientação de 7 dias, o incisivo superior direito de cada animal (exceto grupo C) foi submetido à indução de anquilose¹³ com o objetivo de interromper o processo de erupção contínua, evitar o deslocamento do dispositivo utilizado para a MDI e garantir a padronização da força aplicada. A indução de anquilose foi verificada clinicamente após 14 dias, conforme preconizado por Cuoghi et al.¹³

3.2.2 Movimentação dentária induzida

Os dispositivos para a MDI foram instalados 14 dias após a indução de anquilose. Foi utilizado o dispositivo idealizado por Heller e Nanda,¹⁴ modificado pela substituição da mola de aço por mola de níquel-titânio (Sentalloy®, GAC, New York, NY, EUA) e pela inserção de resina composta fotopolimerizável (Z100®, 3M, St. Paul, MN, USA) na região cervical da face vestibular do incisivo, com o objetivo de melhorar a retenção. O dispositivo consiste numa mola de 3mm de comprimento que, quando distendida, libera uma força de 50cN. As molas foram adaptadas aos primeiros molares superiores direitos e aos incisivos superiores direitos com fio de aço de 0,25mm de diâmetro (Morelli, Sorocaba, SP, Brasil), conforme ilustra a Figura 3.

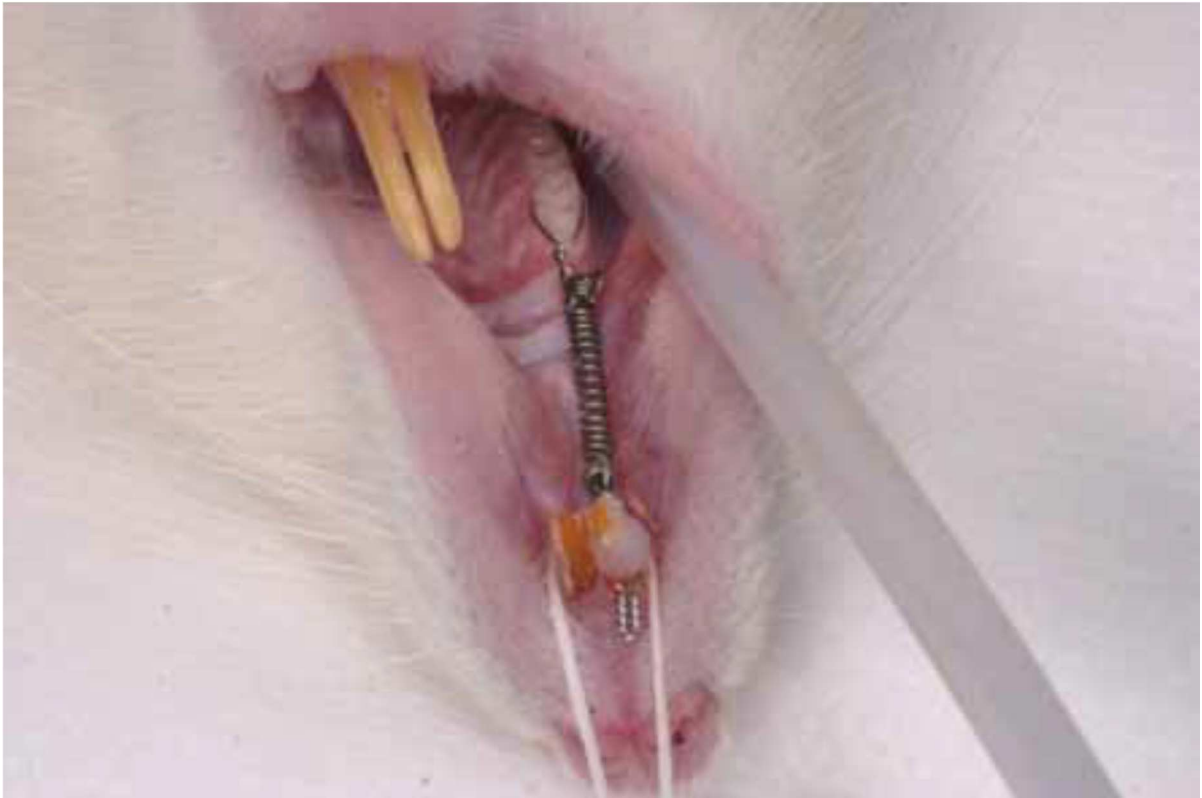


Figura 3 – Dispositivo para MDI instalado e ativado

Fonte: Cuoghi et al.¹³

Para o estabelecimento da FC as molas foram distendidas 3mm e permaneceram ativas durante os períodos experimentais. Para obtenção da FCI as molas foram distendidas 3mm e desativadas/reactivadas durante os períodos experimentais. No grupo FCI 1 as molas foram desativadas após 12hs. Nos grupos FCI 3 e FCI 5 as molas foram desativadas/reactivadas a cada 24hs. Durante a desativação/reactivação das molas os animais foram sedados por inalação de halotano (Tanohalo®, Cristália, Itapira, SP, Brasil).

3.2.3 Obtenção dos dados comportamentais

Completados os períodos experimentais, os dados comportamentais dos animais foram obtidos de acordo com o método preconizado por Yang et al.¹⁵ Os animais foram colocados, um de cada vez, em uma caixa de vidro onde permaneceram por 15min para ambientação. Após, foram filmados durante três períodos de 10min, com intervalos de 20min entre as gravações. Para a obtenção das gravações uma câmera (Canon, Melville, NY, USA) fixada a um tripé foi posicionada na parte superior da caixa. As filmagens foram realizadas em horários compreendidos entre 9:00hs e 12:00hs.

3.3 Eutanásia e obtenção das amostras

Findado o protocolo experimental, os animais foram profundamente anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca com solução de 0,9% de cloreto de sódio (Sigma, Saint Louis, MO, USA) acrescida de 0,1% de heparina (Heparin®, Cristália, Itapira, SP, Brasil) (100 ml), seguida de solução fixadora (800 ml) constituída de 4% de formaldeído (Sigma, Saint Louis, MO, USA) em tampão fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline* – PBS – Sigma, Saint Louis, MO, USA) 0,1M, 4°C, pH 7,4. As maxilas direitas foram dissecadas e submetidas à pós-fixação na mesma solução fixadora por 48hs.

3.4 Processamento histológico e imunoistoquímico

As amostras foram submetidas à desmineralização em PBS (Sigma, Saint Louis, MO, USA) acrescido de 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid* – EDTA – Sigma, Saint Louis, MO, USA) durante 30 dias. Em seguida foram submetidas ao processamento histológico convencional, incluídas em parafina (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) e seccionadas em micrótomo com 4µm de espessura, seguindo um plano de corte no sentido longitudinal, de cervical para apical. Foram coletados cortes semi-seriados que incluíam a coroa e as raízes mesiovestibular (MV) e distovestibular (DV) dos primeiros molares.

Para a análise histomorfométrica as secções histológicas foram submetidas à coloração pela hematoxilina-eosina (HE – Sigma, Saint Louis, MO, USA). Para a análise imunoistoquímica os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol (Sigma, Saint Louis, MO, USA) e hidratados em série decrescente de etanol (Sigma, Saint Louis, MO, USA) (100°GL - 100°GL - 100°GL - 90°GL - 70°GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato (Diva decloaker®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking chamber®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95°C por 20min. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio (Sigma, Saint Louis, MO, USA) por 1h e 1% de soro albumina bovino (Sigma, Saint Louis, MO, USA) por 12hs para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas foram divididas em dois lotes, e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-COX-2 do rato gerado

em coelho (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e anti-IL-1 β do rato gerado em coelho (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado por 2hs e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte por 1h (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit[®], Dako Laboratories, CA, EUA). No final de cada etapa as lâminas foram lavadas em PBS (Sigma, Saint Louis, MO, USA) 0,1 M, pH 7,4. A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit[®], Dako Laboratories, CA, EUA). A contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Harris (Sigma, Saint Louis, MO, USA). Em seguida, as amostras foram desidratadas em etanol (Sigma, Saint Louis, MO, USA), diafanizadas em xilol (Sigma, Saint Louis, MO, USA) e recobertas com meio de montagem (Permount[®], Fisher Scientific, San Diego, CA, USA) e lamínulas de vidro (Knittel, Braunschweig, Germany). Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

3.5 Análise histomorfométrica

Para a análise histomorfométrica as imagens das lâminas histológicas foram capturadas com a utilização de uma câmera digital (JVC TK-1270 Color Vídeo Câmera[®], Long Beach, CA, USA) acoplada a um microscópio óptico (Axiolab[®], Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) e conectada a um microcomputador (Dell, Round Rock, Texas, USA), utilizando-se o programa Zen (Axiolab[®], Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). O aumento utilizado foi de 50x. Realizou-se uma análise quantitativa da área de hialinização no ligamento periodontal (LP) da face mesial da raiz distovestibular (FMDV) dos primeiros molares, utilizando-se o programa ImageJ. Foram demarcadas linhas paralelas delimitando a porção mais cervical e mais apical da FMDV. Medindo-se a distância entre estas duas linhas pôde-se determinar o comprimento linear total da FMDV. Em seguida, foram demarcadas linhas paralelas delimitando a região hialinizada. Medindo-se a distância entre essas duas linhas obteve-se o comprimento linear da região hialinizada (Figura 4). A hialinização foi expressa em porcentagem do comprimento linear total do LP da FMDV.

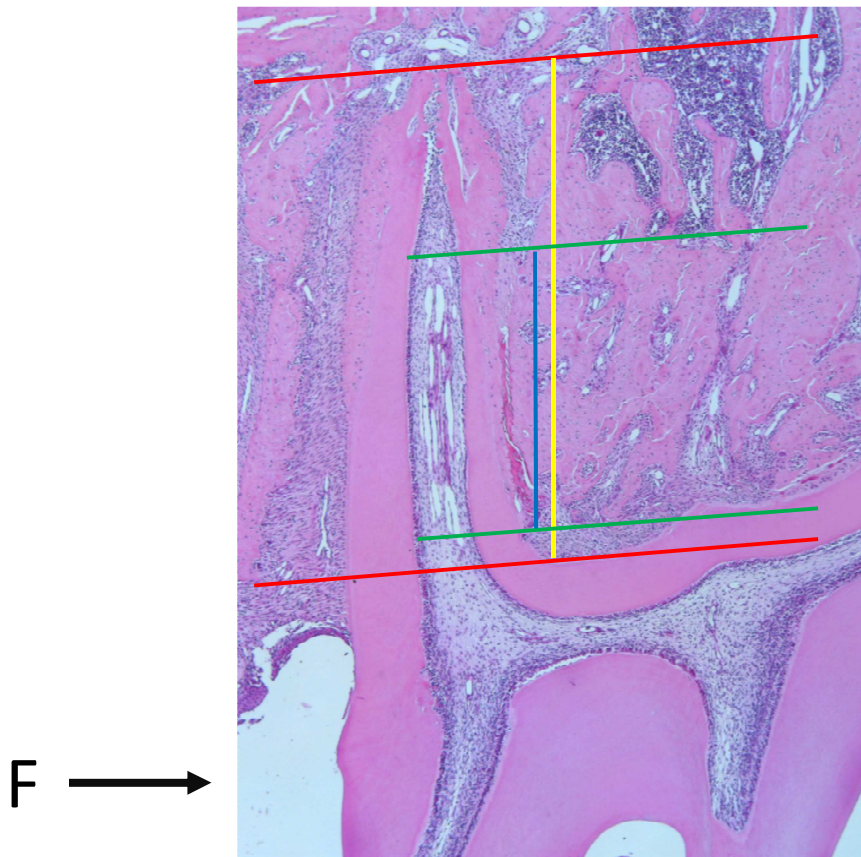


Figura 4 – Análise histomorfométrica

Fonte: elaboração própria.

Nota(s): (a) Linhas vermelhas – demarcação dos limites cervical e apical da FMDV; (b) Linha amarela – comprimento linear da FMDV; (c) Linhas verdes – demarcação dos limites da região hialinizada; (d) Linha azul – comprimento linear da região hialinizada; (e) Aumento de 50x.

3.6 Análise imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica foi efetuada no LP das raízes MV e DV dos primeiros molares. O padrão de imunomarcção para ciclooxygenase-2 (COX-2) e interleucina-1 beta (IL-1 β) foi avaliado em todas as amostras do grupo C para que fosse definido o nível de expressão basal de ambos os marcadores. Os escores foram: escore 0, ausência total de imunomarcção; escore 1, baixo padrão de imunomarcção; escore 2, moderado padrão de imunomarcção; escore 3, alto padrão de imunomarcção.

3.7 Análise comportamental

Para a análise comportamental, os seguintes comportamentos foram considerados:

- a) Andando: quando os animais caminhavam no interior da caixa de vidro;
- b) Escalando: quando os animais subiam apoiando uma ou ambas as patas dianteiras nas paredes da caixa de vidro;
- c) Postura Imóvel: quando os animais não se movimentavam; permaneciam parados, porém acordados;
- d) Descansando/Dormindo: quando os animais permaneciam parados em aparente estado de sonolência, com os olhos abertos ou fechados;
- e) *Directed face grooming* (DFG): quando os animais friccionavam as patas dianteiras sobre a região da boca.

O tempo gasto em cada um destes comportamentos foi quantificado com a utilização de um cronômetro. Posteriormente, calculou-se a representatividade percentual de cada comportamento em relação ao total de tempo de gravação.

3.8 Análise estatística

Os dados foram organizados em planilha do Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA) e analisados com a utilização do programa Statistical Package for the Social Sciences (versão 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

Para o cálculo do erro do método foram repetidas as avaliações em 10% da amostra, selecionados aleatoriamente. A comparação entre as duas análises foi realizada utilizando-se o Coeficiente de Correlação Intraclass e o Coeficiente Kappa.

Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos dados e o teste de Levene para análise da homogeneidade das variâncias. Para a comparação entre os grupos foram utilizados testes paramétricos (ANOVA *one-way* – pós teste de Tukey) e não paramétricos (Kruskal-Wallis – pós teste Mann-Whitney). O Coeficiente de Correlação de Pearson e o Coeficiente de Correlação de Spearman foram utilizados para a análise da correlação entre as variáveis. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Erro do método

O Coeficiente de Correlação Intraclass, aplicado aos resultados das análises histomorfométrica e comportamental, e o Coeficiente Kappa, aplicado aos resultados da análise imunoistoquímica, revelaram resultados acima de 0,8 indicando ótima concordância intraexaminador.

4.2 Hialinização

A Tabela 1 mostra os resultados da análise histomorfométrica da hialinização no ligamento periodontal (LP) na face mesial da raiz distovestibular (FMDV). Pode-se observar a média e o desvio padrão, expressos em porcentagem do comprimento linear total do LP da FMDV, bem como os grupos que apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Tabela 1 – Hialinização – FMDV

	Grupo						
	FC 1	FC 3	FC 5	FCI 1	FCI 3	FCI 5	C
Média (%)	49,48 ^A	53,25 ^A	51,75 ^A	59,39 ^A	57,12 ^A	52,11 ^A	0,00 ^B
Desvio Padrão	±6,36	±4,02	±8,80	±5,98	±15,15	±9,47	±0,00

Fonte: elaboração própria.

Nota(s): Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (ANOVA one-way, teste Tukey para comparações múltiplas, $p < 0,05$).

Todos os grupos submetidos à movimentação dentária induzida (MDI) apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos submetidos à MDI, mesmo variando-se o tipo de força aplicada e o período experimental.

4.3 Mediadores químicos

A Tabela 2 apresenta os resultados da análise imunoistoquímica.

Tabela 2 – Padrão de imunomarcção para COX-2 e IL-1 β

Grupo	Escore	
	COX-2	IL-1 β
FC 1/FCI 1	3 ^A	3 ^A
FC 3/FCI 3	2 ^B	3 ^A
FC 5	2/1 ^B	2 ^B
FCI 5	2/1 ^B	2/1 ^B
C	1 ^B	1 ^B

Fonte: elaboração própria.

Nota(s): Escores seguidos por letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis, teste de Mann-Whitney para comparações múltiplas, $p < 0,0167$).

No grupo FC 1 e FCI 1 prevaleceu um alto padrão de imunomarcção para COX-2 e IL-1 β (escore 3). Em FC 3 e FCI 3 prevaleceu um moderado padrão de imunomarcção para COX-2 (escore 2) e alto padrão de imunomarcção para IL-1 β (escore 3). No grupo FC 5 e FCI 5 o padrão de imunomarcção para COX-2 variou de moderado à baixo (escore 2/1), enquanto a imunomarcção para IL-1 β foi moderada (escore 2) em FC 5 e variou de moderada à baixa em FCI 5 (escore 2/1). No grupo C tanto para COX-2 como para IL-1 β prevaleceu um baixo padrão de imunomarcção (escore 1).

Os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa para a imunomarcção, tanto para COX-2 como para IL-1 β (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). Testes de Mann-Whitney foram utilizados para acompanhamento deste achado. Uma correção de Bonferroni foi aplicada e todas as comparações foram testadas no nível de significância de 0,0167. Quanto à imunomarcção para COX-2, os grupos FC 1 e FCI 1 apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos. Em relação à imunomarcção para IL-1 β , os grupos FC 1, FCI 1, FC 3 e FCI 3 apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos demais.

4.4 Comportamento

Os resultados da análise comportamental podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3 – Tempo gasto em cada comportamento (%; média $\pm$ desvio padrão)

Grupo	Comportamento				
	Andando	Escalando	Postura Imóvel	Descansando/ Dormindo	DFG
FC 1	3,19 $\pm$ 2,11 ^A	0,32 $\pm$ 0,12 ^A	12,26 $\pm$ 3,73 ^A	63,44 $\pm$ 12,69 ^A	4,93 $\pm$ 3,60 ^A
FC 3	5,91 $\pm$ 5,71 ^A	0,78 $\pm$ 1,03 ^{A,B}	45,38 $\pm$ 33,55 ^A	32,20 $\pm$ 42,25 ^A	5,26 $\pm$ 6,75 ^A
FC 5	6,45 $\pm$ 4,60 ^A	0,72 $\pm$ 1,14 ^{A,B}	31,42 $\pm$ 23,14 ^A	42,15 $\pm$ 31,26 ^A	4,45 $\pm$ 3,85 ^A
FCI 1	6,15 $\pm$ 5,85 ^A	0,47 $\pm$ 0,51 ^A	26,44 $\pm$ 20,11 ^A	53,85 $\pm$ 13,71 ^A	4,77 $\pm$ 3,13 ^A
FCI 3	10,46 $\pm$ 5,81 ^{A,B}	1,38 $\pm$ 1,08 ^{A,B}	30,51 $\pm$ 17,89 ^A	46,89 $\pm$ 25,69 ^A	6,75 $\pm$ 5,32 ^A
FCI 5	10,02 $\pm$ 5,61 ^{A,B}	1,80 $\pm$ 1,49 ^{A,B}	26,81 $\pm$ 20,78 ^A	29,85 $\pm$ 26,32 ^A	7,50 $\pm$ 4,64 ^A
C	21,41 $\pm$ 12,99 ^B	4,69 $\pm$ 4,16 ^B	38,31 $\pm$ 29,94 ^A	9,57 $\pm$ 13,28 ^A	4,43 $\pm$ 3,29 ^A

Fonte: elaboração própria.

Nota(s): Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (ANOVA one-way, teste Tukey para comparações múltiplas, $p < 0,05$).

Houve diferença estatisticamente significativa para o comportamento Andando entre o Grupo C e os Grupos FC 1, FC 3, FC 5 e FCI 1 ($p < 0,05$). Para o comportamento Escalando, o Grupo C apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos Grupos FC 1 e FCI 1 ($p < 0,05$). Para os demais comportamentos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4.5 Correlação entre hialinização e mediadores químicos

A hialinização apresentou correlação positiva moderada com a presença de COX-2 ($r_s = 0,404$) e de IL-1 β ($r_s = 0,429$). Ambos os resultados foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

4.6 Correlação entre hialinização e comportamento

A hialinização apresentou correlação negativa moderada com o comportamento Andando ($r = -0,586$) e com o comportamento Escalando ($r = -0,573$). Ambos os resultados foram estatisticamente significativos ($p < 0,01$). Também houve correlação positiva moderada estatisticamente significativa entre a hialinização e o comportamento Descansando/Dormindo ($r = 0,467$, $p < 0,01$).

A Figura 5 ilustra os diagramas de dispersão da correlação entre hialinização e os comportamentos avaliados.

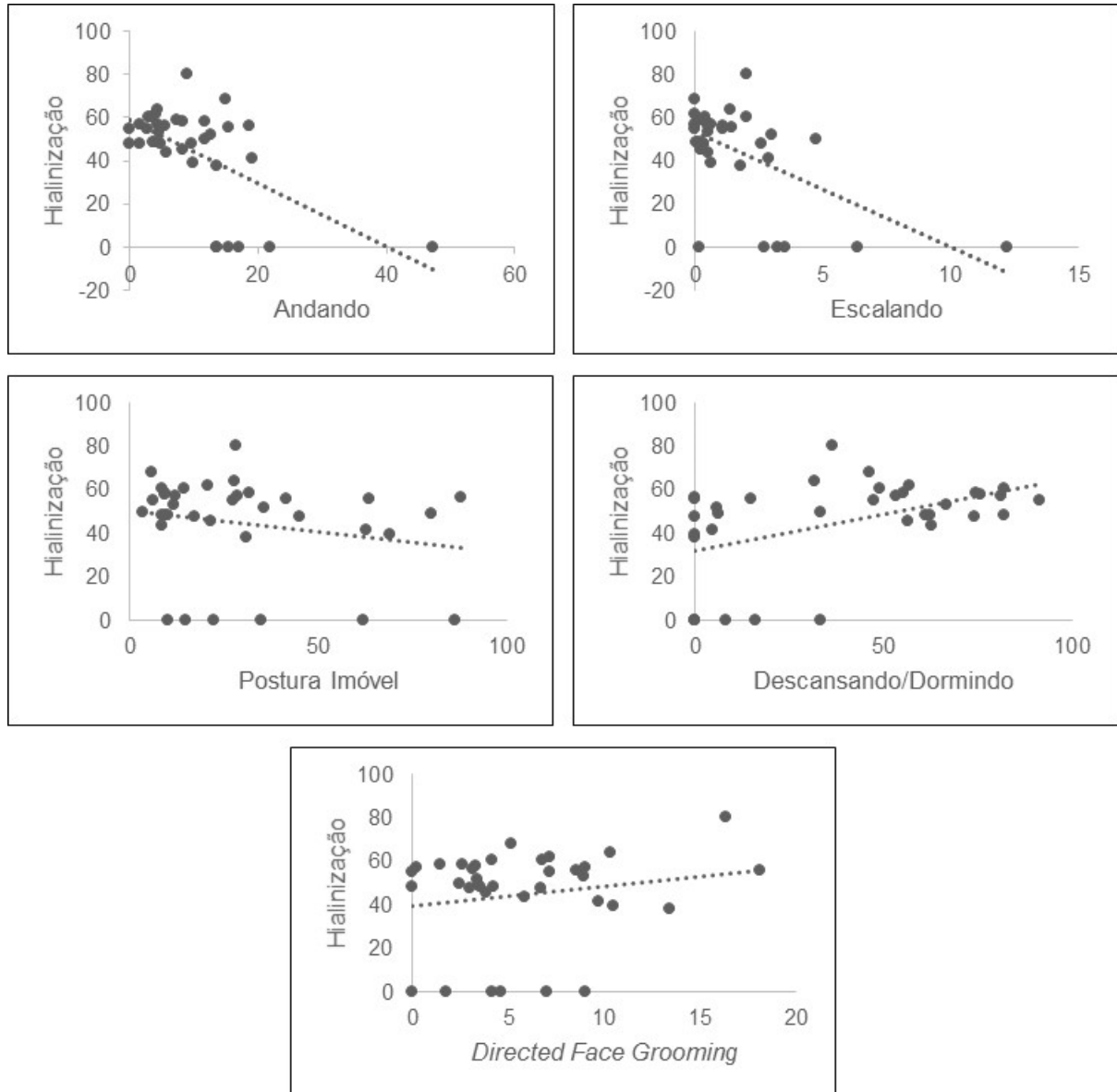


Figura 5 – Correlação entre hialinização e comportamentos

Fonte: elaboração própria.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo verificar a correlação entre dor e reações teciduais indesejadas da movimentação dentária induzida (MDI). Foi realizado um estudo experimental em ratos, submetidos a MDI por força contínua (FC) e força contínua interrompida (FCI). Optou-se por avaliar estes dois tipos de força já que são os mais utilizados na ortodontia corretiva. A força intermitente é aplicada predominantemente durante o uso de aparelhos removíveis e este não foi o foco deste estudo.

Como reação tecidual indesejada, optou-se por investigar a hialinização no ligamento periodontal (LP). A utilização de forças inadequadas pode levar à compressão excessiva do LP, gerando hipóxia ou anóxia. A criação de um ambiente desfavorável induz à formação de áreas livres de células e com grande concentração proteica – as áreas de hialinização. A ausência de células e vasos sanguíneos viáveis nas áreas hialinas requer que os eventos responsáveis pela reabsorção óssea ocorram a distância. Este tipo de reabsorção pode levar a maior perda óssea, mobilidade dentária e atraso na movimentação. Além disso, o processo de reabsorção das áreas hialinas visando à reorganização do LP pode resultar em atraso na movimentação dentária, bem como em estímulo à reabsorção radicular.¹⁻⁴

Para avaliar a dor associada à MDI, dois parâmetros foram utilizados: a presença de mediadores químicos no LP e o comportamento dos animais. A dor decorrente da MDI é gerada tanto pela estimulação mecânica quanto pela reação inflamatória no LP e diversos mediadores químicos estão envolvidos nesse processo, tais como citocinas, prostaglandinas e leucotrienos, além de neuropeptídeos, como a substância P.^{12,16-18} Especificamente, estudos evidenciaram a correlação entre a presença de interleucina-1 beta (IL-1 β)^{19,20} e prostaglandina E₂¹⁹ no fluido crevicular de pacientes submetidos à MDI e a intensidade de dor relatada. Esta correlação também foi demonstrada por Ren e Vissink²¹ por meio de uma revisão sistemática de literatura. A ação da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) sobre o ácido araquidônico consiste na principal forma de produção de prostaglandina E₂ induzida por estímulo inflamatório.²² Estas evidências embasaram a investigação de IL-1 β e COX-2 neste trabalho.

Diversos estudos buscaram avaliar dor em ratos por meio da análise do comportamento, sendo o *grooming* uma das principais atividades observadas.²³⁻²⁵ O *grooming* é um comportamento normal em roedores, caracterizado por episódios prolongados de cuidado com a pelagem de forma bastante organizada, nos quais as patas, a língua e os incisivos são friccionados contra diferentes partes do corpo. A fricção das patas dianteiras sobre a face denomina-se *face grooming*. O *grooming* está associado a limpeza, termorregulação e distribuição de ferormônios para fins de sinalização social. Além disso, pode ocorrer como resposta a estímulos dolorosos. Nesse caso, diferencia-se pela maior intensidade, menor duração e direcionamento específico para a área irritada ou dolorosa.^{15,25} Além das atividades relacionadas ao *grooming*, Vos et al.²⁴ evidenciaram que ratos submetidos a estímulos dolorosos apresentaram redução no seu comportamento exploratório.

Comportamentos associados a dor também foram observados em ratos submetidos à MDI. Yozgatian et al.²⁶ e Shibazaki et al.²⁷ observaram tanto redução do comportamento exploratório quanto aumento do *face grooming*. Yang et al.¹⁵ apresentaram um modelo experimental de dor provocada pela MDI em ratos, baseado no *face grooming* direcionado para a área afetada – *directed face grooming* (DFG). Os autores avaliaram o comportamento dos animais após a MDI em diferentes períodos experimentais. Também avaliaram a sua reação mediante aumentos progressivos na magnitude da força e após múltiplas aplicações da mesma magnitude de força. Os autores apontaram o DFG como uma medida confiável para avaliação de dor decorrente de MDI em ratos. A relação entre DFG e dor em animais submetidos à MDI também foi reportada por Yang et al.²⁸ e Gao e Duan.²⁹

Os resultados deste trabalho revelaram que a hialinização no LP ocorreu em todos os grupos submetidos à MDI, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, mesmo variando-se o tipo de força aplicada e o período experimental. Sobre este aspecto, Burstone³⁰ ressalta que é muito difícil alcançar movimento dentário sem danos patológicos.

Quanto aos mediadores químicos, os resultados revelaram uma alta concentração de COX-2 1 dia após o início da MDI, com redução progressiva à medida que aumentou o tempo experimental. Para IL-1 β , a concentração em 1 dia foi igual à observada em 3 dias após o início da MDI, declinando no período experimental de 5

dias. Estes resultados sugerem maior experiência de dor nos períodos iniciais da MDI, independentemente do tipo de força aplicado.

Em relação ao comportamento, tanto o DFG como comportamentos relacionados a uma maior (Andando; Escalando) ou menor (Postura Imóvel; Descansando/Dormindo) atividade exploratória foram avaliados. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para o DFG, seja entre os grupos submetidos à MDI ou entre estes e o Grupo C.

Por outro lado, observou-se redução no comportamento exploratório dos grupos movimentados em relação ao Grupo C, o que sugere que os animais submetidos à MDI apresentaram dor. Esta redução foi estatisticamente significativa para o comportamento Andando entre o Grupo C e os Grupos FC 1, FC 3, FC 5 e FCI 1 e para o comportamento Escalando entre o Grupo C e os Grupos FC 1 e FCI 1. Embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa para o comportamento Descansando/Dormindo, observou-se que o tempo gasto neste comportamento foi menor no Grupo C em relação aos grupos submetidos à MDI, o que corrobora a redução da atividade exploratória nestes últimos. Ressalta-se que o tempo gasto neste comportamento foi consideravelmente maior no grupo FC 1 e também esteve aumentado no grupo FCI 1. Estes resultados sugerem que os animais submetidos à MDI com FC experimentaram mais dor do que os animais submetidos à MDI com FCI e que o período experimental de 1 dia esteve mais relacionado com a ocorrência de dor.

Os resultados deste trabalho também mostraram que a hialinização esteve correlacionada positivamente com a presença de mediadores químicos associados à nocicepção no LP. Além disso, apresentou correlação negativa com comportamentos exploratórios (Andando e Escalando) e positiva com o comportamento Descansando/Dormindo, o qual consiste num comportamento oposto à atividade exploratória. Estes resultados sugerem que a ocorrência de dor durante a MDI está associada à formação de áreas de hialinização no LP.

O controle dos efeitos colaterais indesejados da MDI está relacionado à aplicação de forças biologicamente aceitáveis durante o tratamento. A preocupação em quantificar as forças ortodônticas para obter-se uma força ótima ou ideal é antiga. Schwarz,³¹ em 1932, afirmava que a força ortodôntica ótima corresponde à força que o sangue exerce nas paredes dos vasos da microcirculação, ou seja, entre 15 e 20

mmHg, o que corresponde a 20 a 26 g/cm² na superfície da raiz. Ren et al.,¹¹ por meio de uma revisão sistemática de literatura, concluíram que não existe evidência acerca do nível de força ótimo na Ortodontia. De acordo com Krishnan e Davidovitch,¹ o conceito atual de força ortodôntica ótima é estabelecido por um estímulo mecânico extrínseco que leva à máxima taxa de movimentação com o mínimo de dano tecidual e de dor e desconforto para o paciente.

O conceito de força ortodôntica ótima é, portanto, teórico e subjetivo. Além disso, a Ortodontia não dispõe de recursos tecnológicos que permitam ao profissional mensurar, com um mínimo de precisão, a intensidade de força aplicada em uma determinada região da raiz dentária. A força exercida por um determinado aparelho, como uma mola, por exemplo, pode ser facilmente medida. Porém, como essa força vai ser distribuída sobre uma determinada área da raiz ainda é uma questão que não pode ser respondida.¹ Com frequência os conceitos de forças “leves ou suaves” e “pesadas ou intensas” são utilizados na Ortodontia, advogando-se que as forças suaves são as mais indicadas por serem mais fisiológicas. No entanto, deve-se considerar que o estresse ortodôntico nunca é distribuído igualmente no LP.³² Além disso, a variabilidade individual deve ser considerada, haja vista que uma força pode ser intensa para um periodonto e suave para outro. Do mesmo modo, a mesma intensidade de força pode ser considerada suave para um movimento de translação e intensa para um movimento de inclinação.

Sendo assim, este trabalho foi desenvolvido no intuito de verificar a correlação entre dor e reações teciduais indesejadas da MDI, na busca por um critério clínico que pudesse nortear a aplicação das forças ortodônticas adequadas. Seus resultados mostram que houve correlação entre dor e reações teciduais indesejadas da MDI. Desse modo, indicam que a dor relatada pelo paciente pode ser utilizada como critério clínico para auxiliar na determinação da força ortodôntica adequada, de forma que os danos teciduais associados ao tratamento ortodôntico possam ser minimizados.

Convém salientar que os comportamentos associados a dor foram mais marcantes nos períodos iniciais da MDI e a presença de mediadores químicos associados à nocicepção diminuiu ao longo dos períodos experimentais, enquanto que a quantidade de hialinização permaneceu inalterada. Portanto, outros trabalhos com períodos experimentais mais extensos serão necessários para determinar a relação temporal entre a redução da experiência de dor e do processo de hialinização.

Até o momento, este trabalho enfatiza que a manifestação de sensibilidade dolorosa, seja pelo emprego da mecânica ortodôntica ou mesmo por trauma oclusal, deve sinalizar para uma condição desfavorável de recuperação do periodonto. Também fica evidenciado que a sensação de dor pode diminuir sem que o LP tenha restabelecido a sua condição de normalidade.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo, de acordo com a metodologia empregada, verificou-se que:

1. Não houve diferença estatisticamente significativa para a hialinização no ligamento periodontal (LP) em relação ao tipo de força aplicada – força contínua (FC) e força contínua interrompida (FCI) – e ao período experimental (1, 3 e 5 dias);
2. A presença de ciclooxigenase-2 (COX-2) no LP foi significativamente maior nos períodos experimentais de 1 dia, independentemente do tipo de força (FC ou FCI);
3. A presença de interleucina-1 beta (IL-1 β) foi significativamente maior nos períodos experimentais de 1 e 3 dias, independentemente do tipo de força (FC ou FCI);
4. Os grupos FC 1, FC 3, FC 5 e FCI 1 gastaram significativamente menos tempo no comportamento Andando do que o grupo C;
5. Os grupos FC 1 e FCI 1 gastaram significativamente menos tempo no comportamento Escalando do que o grupo C;
6. Houve correlação positiva moderada significativa entre hialinização e presença de mediadores químicos associados à nocicepção (COX-2 e IL-1 β) no LP;
7. Houve correlação negativa moderada significativa entre hialinização no LP e comportamentos exploratórios (Andando/Escalando);
8. Houve correlação positiva moderada significativa entre hialinização no LP e o comportamento Descansando/Dormindo.

Os resultados sugerem que a experiência de dor é mais intensa nos períodos iniciais da movimentação dentária induzida (MDI). Além disso, a FC parece estar mais relacionada à ocorrência de dor do que a FCI. Os resultados também indicam que a experiência de dor durante a MDI está associada à formação de áreas de hialinização no LP. Sugerem, portanto, que existe correlação entre dor e reações teciduais indesejadas da MDI.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIASⁱⁱ

1. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129:469.e1-32.
2. Brezniak N, Wasserstein A. Root resorption after orthodontic treatment: part 1. Literature review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1993;103:62-6.
3. Brudvik P, Rygh P. Root resorption beneath the main hyalinized zone. *Eur J Orthod* 1994;16:249-63.
4. Harris EF. Root resorption during orthodontic therapy. *Semin Orthod* 2000;6:183-94.
5. Cuoghi OA, Aiello CA, Consolaro A, Tondelli PM, Mendonça MR. Resorption of roots of different dimension induced by different types of forces. *Braz Oral Res* 2014;28:1-7.
6. Proffit WR, Fields HW, Sarver DM. *Contemporary Orthodontics*. St. Louis:Elsevier; 2009.
7. Weiland F. Constant versus dissipating forces in orthodontics: the effect on initial tooth movement and root resorption. *Eur J Orthod* 2003;25:335-42.
8. Maltha JC, van Leeuwen EJ, Dijkman GE, Kuijpers-Jagtman AM. Incidence and severity of root resorption in orthodontically moved premolars in dogs. *Orthod Craniofac Res* 2004;7:115-21.
9. Ballard DJ, Jones AS, Petocz P, Darendeliler MA. Physical properties of root cementum: Part 11. Continuous vs intermittent controlled orthodontic forces on root resorption. A microcomputed-tomography study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;136:e1-8.e8.
10. Kameyama T, Matsumoto Y, Warita H, Soma K. Inactivated periods of constant orthodontic forces related to desirable tooth movement in rats. *J Orthod* 2003;30:31-7.
11. Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Optimum force magnitude for orthodontic tooth movement: a systematic literature review. *Angle Orthod* 2003;73:86-92.
12. Krishnan V. Orthodontic pain: from causes to management – a review. *Eur J Orthod* 2007;29:170-9.
13. 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;30:112-7.

ⁱⁱ O trabalho foi elaborado de acordo com as normas do periódico *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* (Anexo A).

14. 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.
15. Yang Z, Luo W, Hou J, Zhao Z, Jian F, Wamalwa P, et al. Development of a behavior model of pain induced by experimental tooth movement in rats. *Eur J Oral Sci* 2009;117:380-4.
16. Saito M, Saito S, Ngan PW, Shanfeld JL, Davidovitch Z. Interleukin-1 beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1991;99:226-40.
17. Grieve III WG, Johnson GK, Moore RN, Reinhardt RA, DuBois LM. Prostaglandin E (PGE) and interleukin-1 beta (IL-1 β) levels in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1994;105:369-74.
18. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhet M. Orthodontic movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;119:307-12.
19. Giannopoulou C, Dudic A, Kiliaridis S. Pain discomfort and crevicular fluid changes induced by orthodontic elastic separators in children. *J Pain* 2006;7:367-76.
20. Luppapanornlarp S, Kajii TS, Surarit R, Iida J. Interleukin-1b levels, pain intensity, and tooth movement using two different magnitudes of continuous orthodontic force. *Eur J Orthod* 2010;32:596-601.
21. Ren Y, Vissink A. Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. *Eur J Oral Sci* 2008;116:89-97.
22. McAdam BF, Mardini IA, Habib A, Burke A, Lawson JA, Kapoor S, et al. Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation. *J Clin Invest* 2000;105:1473-82.
23. Clavelou P, Pajot J, Dallel R, Raboisson P. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. *Neurosci Lett* 1989;103:349-53.
24. Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J. Neurosci* 1994;14:2708-23.
25. Vos BP, Hans G, Adriaensen H. Behavioral assessment of facial pain in rats: face grooming patterns after painful and non-painful sensory disturbances in the territory of the rat's infraorbital nerve. *Pain* 1998;76:173-78.
26. Yozgatian JH, Zeredo JL, Hotokezaka H, Koga Y, Toda K, Yoshida N. Emotional stress- and pain-related behaviors evoked by experimental tooth movement. *Angle Orthod* 2008;78:487-94.

27. Shibazaki T, Yozgatian JH, Zeredo JL, Gonzales C, Hotokezaka H, Koga Y, et al. Effect of celecoxib on emotional stress and pain-related behaviors evoked by experimental tooth movement in the rat. *Angle Orthod* 2009;79:1169-74.
28. Yang Z, Cao Y, Wang Y, Luo W, Hua X, Lu Y, et al. Behavioural responses and expression of P2X₃ receptor in trigeminal ganglion after experimental tooth movement in rats. *Arch Oral Biol* 2009;54:63-70.
29. Gao Y, Duan YZ. Increased COX2 in the trigeminal nucleus caudalis is involved in orofacial pain induced by experimental tooth movement. *Anat Rec* 2010;293:485-91.
30. Burstone CJ. Application of bioengineering to clinical orthodontics. In: Graber TM, Vanarsdall RL, editors. *Orthodontics: current principles and techniques*. St. Louis: Mosby; 1994. p. 235-67.
31. Schwarz AM. Tissue changes incidental to orthodontic tooth movement. *Internat J Ortho* 1932;18:331.
32. Burstone CJ. The biomechanics of tooth movement. In: Kraus BS, Riedel RA, editors. *Vistas in Orthodontics*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1962. p. 197-213.
33. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 2016. Available at: <<http://www.ajodo.org/content/authorinfo>>. Accessed at 22 nov 2016.
34. Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (CEUA). 2014.

ANEXOS

Anexo A – Normas para publicação (Continua)

Guidelines for Original Articles

Submit Original Articles via EES: <http://ees.elsevier.com/ajodo>.

Before you begin, please review the guidelines below. To view a 7minute video explaining how to prepare your article for submission, go to Video on Manuscript Preparation.

1. *Title Page*. Put all information pertaining to the authors in a separate document. Include the title of the article, full name(s) of the author(s), academic degrees, and institutional affiliations and positions; identify the corresponding author and include an address, telephone and fax numbers, and an email address. This information will not be available to the reviewers.

2. *Abstract*. Structured abstracts of 200 words or less are preferred. A structured abstract contains the following sections: Introduction, describing the problem; Methods, describing how the study was performed; Results, describing the primary results; and Conclusions, reporting what the authors conclude from the findings and any clinical implications.

3. *Manuscript*. The manuscript proper should be organized in the following sections: Introduction and literature review, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, and Figure captions. Express measurements in metric units, whenever practical. Refer to teeth by their full name or their FDI tooth number. For style questions, refer to the *AMA Manual of Style, 10th edition*. Cite references selectively, and number them in the order cited. Make sure that all references have been mentioned in the text. Follow the format for references in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997;126:3647); <http://www.icmje.org>. Include the list of references with the manuscript proper. Submit figures and tables separately (see below); do not embed figures in the word processing document.

4. *Figures*. Digital images should be in TIF or EPS format, CMYK or grayscale, at least 5 inches wide and at least 300 pixels per inch (118 pixels per cm). Do not embed images in a word processing program. If published, images could be reduced to 1 column width (about 3 inches), so authors should ensure that figures will remain legible at that scale. For best results, avoid screening, shading, and colored backgrounds; use the simplest patterns available to indicate differences in charts. If a figure has been previously published, the legend (included in the manuscript proper) must give full credit to the original source, and written permission from the original publisher must be included. Be sure you have mentioned each figure, in order, in the text.

5. *Tables*. Tables should be self-explanatory and should supplement, not duplicate, the text. Number them with Roman numerals, in the order they are mentioned in the text. Provide a brief title for each. If a table has been previously published, include a footnote in the table giving full credit to the original source and include written permission for its use from the copyright holder. Submit tables as text-based files (Word is preferred, Excel is accepted) and not as graphic elements. Do not use colors, shading, boldface, or italic in tables. Do not submit tables as parts A and B; divide into 2 separate tables. Do not "protect" tables by making them "readonly". The table title should be put above the table and not as a cell in the table. Similarly, table footnotes should be under the table, not table cells.

6. *Model release and permission forms*. Photographs of identifiable persons must be accompanied by a release signed by the person or both living parents or the guardian of minors. Illustrations or tables that have appeared in copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the copyright owner and original author, and the legend must properly credit the source. Permission also must be obtained to use modified tables or figures.

7. *Copyright release*. In accordance with the Copyright Act of 1976, which became effective February 1, 1978, all manuscripts must be accompanied by the following written statement, signed by all authors: *"The undersigned author(s) transfers all copyright ownership of the manuscript [insert title of article here] to the American Association of Orthodontists in the event the work is published. The undersigned author(s) warrants that the article is original, does not infringe upon any copyright or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, has not been previously published, and includes any product that may derive from the published journal, whether print or electronic media. I (we) sign for and accept responsibility for releasing this material."* Scan the printed copyright release and submit it via EES.

Fonte: American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.³³

Anexo A – Normas para publicação (Continuação)

8. *Use the International Committee of Medical Journal Editors Form for the Disclosure of Conflict of Interest (ICMJE Conflict of Interest Form)*. If the manuscript is accepted, the disclosed information will be published with the article. The usual and customary listing of sources of support and institutional affiliations on the title page is proper and does not imply a conflict of interest. Guest editorials, Letters, and Review articles may be rejected if a conflict of interest exists.

9. *Institutional Review Board approval*. For those articles that report on the results of experiments of treatments where patients or animals have been used as the sample, Institutional Review Board (IRB) approval is mandatory. No experimental studies will be sent out for review without an IRB approval accompanying the manuscript submission.

PREPARATION

Double-blind review

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

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

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

Article structure

Introduction

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

Material and Methods

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

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Conclusions

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

Essential title page information

- **Title**. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations**. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the email address of each author.

Anexo A – Normas para publicação (Continuação)

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the email address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

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

Graphical abstract

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

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

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Acknowledgments

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

Artwork

Image manipulation

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

Electronic artwork

General points

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

Anexo A – Normas para publicação (Continuação)

- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

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

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

Please do not:

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

Color artwork

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

Figure captions

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

Tables

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

References

Citation in text

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

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent

Anexo A – Normas para publicação (Continuação)

link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

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

References in a special issue

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

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/referencemanager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plugins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/usecitationstyle/americanjournaloforthodonticsanddentofacialorthopedic>. When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

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

Examples:

Reference to a journal publication:

1. Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Sci Commun* 2010;163519.

Reference to a book:

2. Strunk Jr W, White EB. The elements of style. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

3. Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age. New York: EPublishing Inc; 2009. p. 281304.

Note shortened form for last page number. e.g., 519, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your

Anexo A – Normas para publicação (Continuação)

video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

3D Models

You can enrich your online articles by providing 3D models (optional) in PLY, OBJ or U3D format, which will be visualized using the interactive viewer next to the article. Each 3D model will have to be zipped and uploaded to online submission system via the "3D models" submission category. Please be advised that the recommended model size before zipping is 50100 MB.

Submission Checklist

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

Ensure that the following items are present: One author has been designated as the corresponding author with contact details: (i) Email address; (ii) Full postal address; (iii) Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain: (i) All figure captions; (ii) All tables (including title, description, footnotes). Further considerations: (i) Manuscript has been 'spellchecked' and 'grammarchecked'; (ii) References are in the correct format for this journal; (iii) All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa; (iv) Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web). For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Permissions

To use information borrowed or adapted from another source, authors must obtain permission from the copyright holder (usually the publisher). This is necessary even if you are the author of the borrowed material. It is essential to begin the process of obtaining permissions early; a delay may require removing the copyrighted material from the article. Give the source of a borrowed table in a footnote to the table; give the source of a borrowed figure in the legend of the figure. The source must also appear in the list of references. Use exact wording required by the copyright holder. To secure permission for materials published in *AJODO*, please visit <http://www.elsevier.com/authors/obtainingpermissiontoreuseelseviermaterial>.

Fonte: American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.³³

Anexo B – Certificado de Aprovação da CEUA



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 da relação entre dor e reações teciduais durante a movimentação dentária induzida por diferentes tipos de força"**, Processo FOA nº 2014-00796, 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 26 de Junho de 2014.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 01 de Agosto de 2016.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Setembro de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Evaluation of the relationship between pain and tissue reactions during induced tooth movement by different types of force"**, Protocol FOA nº 2014-00796, 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 June 26, 2014.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 01, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 01, 2016.

Prof. Dr. Edilson Ervolino
Coordenador 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