UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA
MESTRADO PROFISSIONAL EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

CAROLINA BRIOSCHI MATHIAS

ANÁLISE DE ASPECTOS MORFOLÓGICOS E DA EXPRESSÃO DE TIMP-1 NA CARTILAGEM ARTICULAR DA MANDÍBULA EM CONDIÇÃO DE MÁ OCLUSÃO EXPERIMENTAL

VITÓRIA/ES
2018

CAROLINA BRIOSCHI MATHIAS

ANÁLISE DE ASPECTOS MORFOLÓGICOS E DA EXPRESSÃO DE TIMP-1 NA CARTILAGEM ARTICULAR DA MANDÍBULA EM CONDIÇÃO DE MÁ OCLUSÃO EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Clínica Odontológica do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica.

Orientadora: Profª. Drª. Letícia Nogueira da Gama de Souza Bautz

VITÓRIA/ES
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Mathias, Carolina Brioschi, 1986 -

M431a ANÁLISE DE ASPECTOS MORFOLÓGICOS E DA EXPRESSÃO DE

TIMP-1 NA CARTILAGEM ARTICULAR DA MANDÍBULA EM CONDIÇÃO DE MÁ OCLUSÃO EXPERIMENTAL / Carolina Brioschi Mathias – 2018.

68 f. : il.

Orientador: Leticia Nogueira da Gama de Souza Bautz.

Coorientador: Willian Grassi Bautz.

Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Articulação Temporomandibular. 2. Osteoartrite. 3. Má Oclusão. 4. Inibidor Tecidual de Metaloproteinase-1. I. Bautz, Leticia Nogueira da Gama de Souza. II. Bautz, Willian Grassi. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 616.314

Elaborado por Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O

CAROLINA BRIOSCHI MATHIAS

ANÁLISE DE ASPECTOS MORFOLÓGICOS E DA EXPRESSÃO DE TIMP-1 NA CARTILAGEM ARTICULAR DA MANDÍBULA EM CONDIÇÃO DE MÁ OCLUSÃO EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Clínica Odontológica do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica.

Aprovada em __ de _____ de 20__.

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Profª. Drª. Leticia Nogueira da Gama de Souza Bautz
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

_____

Prof. Dr. Willian Grassi Bautz
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-orientador

_____

Prof. Dr. Marcos da Silva Pacheco
Universidade Federal do Espírito Santo

_____

Prof. Dr. Sergio Lins de Azevedo Vaz
Universidade Federal do Espírito Santo

Ao milagre da vida que se desenvolve,

meu filho Benjamin.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por se fazer tão presente em minha vida. Todos os dias agradeço pela saúde e pelas bênçãos concedidas e por me cercar de bondade e de amor.

Ao meu marido, Nilton, meu encontro de almas e companheiro de vida. Sem seu apoio incondicional certamente eu não teria chegado até aqui. Além de servir como exemplo de profissional, ele me dá todo amor e apoio para que eu alcance meus sonhos. Juntos construímos uma família, um lar e uma vida de conquistas, muito maiores do que eu sonhei.

Aos meus pais, Maria Lourdes e Wilson, que me deram a base e me fizeram tudo o que sou hoje. Eu sei de todas as dificuldades que eles enfrentaram no caminho, mas sempre mantiveram a família unida e priorizaram nossos estudos. O resultado disso são os três filhos formados e pós-graduados, frutos de uma criação que teve como alicerces o amor e a necessidade de seguir o caminho do bem.

Aos meus irmãos, Leonardo e Angela, que mesmo sem saber, têm enorme participação em todas as minhas pequenas vitórias, e aos quais eu amo incondicionalmente. Obrigada por estarem na minha vida e por dividirem todos os momentos, principalmente os de alegria. Estar com eles significa sorrir sem limites.

Aos meus familiares, principalmente meu tio José Dimas Brioschi (*In Memorian*), que foi mais do que um padrinho. Juntos brindamos minha entrada no mestrado e tenho certeza que de onde estiver, juntamente com meu avô, comemora mais essa etapa vencida. E está sempre em meus pensamentos.

Aos meus sogros, Mara e Nilton, por serem tão bons para mim. Sou muito grata pelo apoio e pelo carinho que têm comigo. Me considero e me sinto amada como uma filha.

A minha orientadora, Leticia, pela incrível disponibilidade, dedicação, respeito e carinho na minha orientação. Admiro muito toda inteligência e a personalidade que ela possui. Eu aprendi muito e agradeço pela oportunidade e confiança que depositou em mim. Não posso imaginar concluir o mestrado sem seus grandes ensinamentos.

Ao Willian, meu co-orientador e grande mentor de todas as etapas da minha pesquisa. Agradeço por colocar a mão na massa comigo me guiando em todas as fases, principalmente nos experimentos laboratoriais. As dificuldades foram enfrentadas e vencidas graças à sua disponibilidade e atenção.

Ao professor Marcos Pacheco, coordenador dos meus dois estágios em docência, com quem aprendi que estudar nunca é demais, e que com delicadeza nas palavras e gestos foi um grande colaborador desse trabalho.

Aos meus amigos do mestrado, Lygia, Lorena, Flavia e Vinícius, por estarem comigo e me presentearem com uma amizade que vai além dessa Pós-Graduação. Tenho certeza que todos serão vitoriosos em suas áreas, porque são pessoas que sempre buscam a excelência. Obrigada por momentos tão agradáveis em nossa convivência.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia da UFES, Viviane, Lucienne e Rafaela, por sempre me receberem com carinho e respeito e me auxiliarem nas atividades do Laboratório de Histotécnicas.

A minha secretária, Jaqueline, por sempre manter organizada minha agenda e vida profissional. Além de ter mantido o consultório em ordem durante o mestrado, sempre se demostrou uma amiga em todos os momentos.

A Universidade Federal do Espírito Santo por me oferecer a infraestrutura desde a Graduação para concretização da minha educação.

RESUMO

Introdução: A articulação temporomandibular (ATM) pode ser afetada pelos mesmos processos patológicos de outras articulações do organismo. A osteoartrite (OA) é a desordem de origem articular que mais acomete a ATM e é caracterizada pela degeneração dos tecidos ao seu redor. A OA possui etiologia complexa e a má oclusão é considerada um fator de risco por criar áreas de trauma na cartilagem articular da mandíbula (CAM), aumentando a produção de enzimas que degradam a cartilagem, como as agrecanases e metaloproteinases (MMPs), que são por sua vez reguladas por seus inibidores teciduais (TIMPs). Dentre os 4 tipos de TIMPs existentes, a TIMP-1 é a mais importante pois além de reguladora tecidual das MMPs, desempenha papel de molécula sinalizadora em processos biológicos importantes. **Objetivo:** Investigar os aspectos morfológicos da CAM diante de má oclusão experimental e avaliar as mudanças na expressão de TIMP-1. **Métodos:** Foram utilizadas 24 fêmeas de ratos Wistar com 8 semanas de vida divididas em grupo controle e tratado, com dois tempos experimentais (2 e 4 semanas). Os animais foram submetidos à uma desordem oclusal sagital através da movimentação mesial dos primeiros molares e distalização dos terceiros unilateralmente e em lados opostos das arcadas. Ao final de 2 e 4 semanas, as alterações morfológicas na CAM foram avaliadas. A expressão de TIMP-1 foi detectada por técnica imuno-histoquímica. As análises quantitativas foram feitas através de software de imagem e passaram por análise estatística através da aplicação dos testes Qui Quadrado e Mann Whitney. **Resultados:** Animais tratados por 2 e 4 semanas apresentaram alterações degenerativas na CAM características de OA. Os principais achados foram espessamento do terço posterior, desarranjo das camadas, atividade osteoclástica e formação de osteófito. Presença de condrócitos com núcleo condensado e redução do citoplasma foram observados e caracterizam menor atividade celular. A expressão de TIMP-1 nos animais controle foi observada apenas na camada madura. Já nos tratados, células imunopositivas foram encontradas nas camadas proliferativa e madura, sendo que nos animais tratados por 2 semanas o terço posterior apresentou maior número de células imunomarcadas do que o grupo controle (P= 0.0291). **Conclusão:** O estudo demonstrou que uma desordem oclusal pode levar a respostas degenerativas na CAM acompanhadas de alterações na expressão de TIMP-1.

Palavras-chave: Articulacão Temporomandibular, Osteoartrite, Má Oclusão, Inibidor Tecidual de Metaloproteinase-1.

ABSTRACT

Background: The temporomandibular joint (TMJ) can be affected by the same pathological process as the other joints in the human body. Osteoarthritis (OA) is the most common temporomandibular disorder and it is characterized by the degeneration of the cartilage tissue and even the bone below. OA has a complex etiology and disordered occlusion is considered a risk factor because it can create a compression of the cartilage tissue leading to the expression of various cytokines and chemokines, such as the matrix metalloproteinases which activity is regulated by the tissue Inhibitors of the metalloproteinases (TIMP). Among the four existing types of TIMP, TIMP-1 is the most important because it can act as a signaling molecule independent of MMP inhibition thereby influencing important biological processes. **Aim:** To investigate the responses of mandibular condylar cartilage to experimentally induced disordered occlusion and to evaluate changes in the expression of the TIMP-1 molecule. **Methods:** Twenty-four female Wistar rats at the age of 8 weeks were enrolled in this study. The animals were randomly divided into experimental and control groups and further divided into four subgroups for two time points (2 and 4 weeks). Experimentally induced sagittal disordered occlusion were created by moving the first molars mesially and distalizing the third molars unilaterally and in opposite sides of the dental arches. At the end of two and four weeks, remodeling of the mandibular condylar cartilage was assessed. Protein expression of TIMP-1 were investigated by means of immunohistochemical staining. The quantitative analysis were made through an image software and statistical analysis by chi-square and Mann-Whitney tests were performed. The statistical significance was defined as $P < 0.05$. **Results**: In the 2- and 4-week experimental groups OA-like changes were observed. The most common changes were the increased thickness of the posterior third, disarrangement of the layers disposition, osteoclastic activity and osteophyte formation. Also were found cellular alterations that took form of pyknotic nuclei and condensed cytoplasm chondrocytes and characterize diminution of metabolic activity. The TIMP-1 expression was shown in the mature layers of the control group. However, in the experimental group, immunopositive cells were found in the proliferative and mature layers being that the posterior third of the 2-week experimental group presented a higher level of TIMP-1-positive cells when compared to the correspondent control ($P = 0.0291$).

Conclusion: The present results indicate that the experimentally created disordered occlusion led to degenerative responses accompanied by changes in the expression of TIMP-1 in mandibular condyle cartilage.

Keywords: Temporomandibular Joint, Osteoarthritis, Malocclusion, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATM	Articulação Temporomandibular
CAM	Cartilagem Articular da Mandíbula
DTM	Desordem Temporomandibular
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinase da Matriz
OA	Osteoartrite
OAATM	Osteoatrite da Articulação Temporomandibular
TIMP-1	Inibidor Tecidual de Metaloproteinase-1
HE	Hematoxilina e Eosina
IHQ	Imuno-histoquímica
kDa	Kilodalton
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

LISTA DE TABELAS

Artigo 1: Alterações na cartilagem articular da mandíbula e mudanças na expressão de TIMP-1 em condição de má oclusão experimental

Tabela I – Distribuição dos aspectos morfológicos observados nos grupos tratados 40

Tabela II – Distribuição das células marcadas para a TIMP-1 nos terços da CAM nos diferentes tempos experimentais..... 41

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1: Alterações na cartilagem articular da mandíbula e mudanças na expressão de TIMP-1 em condição de má oclusão experimental

Figura 1- Manipulação dos ratos e esquema do desajuste oclusal..... 34

Figura 2- Metodologia de análise da CAM..... 35

Figura 3- Aspectos teciduais e celulares da CAM de animais controle e tratados por 2 semanas..... 36

Figura 4- Aspectos teciduais e celulares da CAM de animais controle e tratados por 4 semanas..... 37

Figura 5- Correspondência entre alterações teciduais e expressão de TIMP-1 na CAM dos animais tratados..... 38

Figura 6- Imuno-histoquímica da TIMP-1 na CAM nos diferentes tempos experimentais..... 39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 14
2 OBJETIVOS 19
2.1 OBJETIVO GERAL 19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 19
3 RESULTADOS 20
3.1 ARTIGO: ALTERAÇÕES NA CARTILAGEM ARTICULAR DA MANDÍBULA E MUDANÇAS NA EXPRESSÃO DE TIMP-1 EM CONDIÇÃO DE MÁ OCLUSÃO EXPERIMENTAL 20
3.1.1 Introdução 22
3.1.2 Materiais e métodos 24
3.1.3 Resultados 27
3.1.4 Discussão 29
3.1.5 Conclusão 32
3.1.6 Financiamento 33
Referências 34
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS 45
REFERÊNCIAS GERAIS 46
ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS 48
ANEXO B – DATASHEET TIMP-1 49
ANEXO C – NORMAS DA AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS 50

1 INTRODUÇÃO GERAL

A articulação temporomandibular (ATM) é uma das mais complexas articulações do corpo humano e parte do sistema estomatognático. É responsável pelos movimentos mastigatórios e por outras atividades funcionais, como fala e deglutição.[1]

Os elementos ósseos que formam a ATM são a fossa mandibular e tubérculo articular do osso temporal superiormente, e a cabeça da mandíbula inferiormente. Situado entre essas duas superfícies ósseas, existe um disco articular bicôncavo, que permite o deslize ósseo, acomodando o estresse gerado pela rotação e translação da cabeça da mandíbula durante a abertura e fechamento da boca.[2]

A cartilagem articular da mandíbula (CAM) é uma estrutura especializada presente na superfície da cabeça da mandibula. Durante o período de crescimento, a CAM manifesta as funções de crescimento endocondral da mandíbula e de cartilagem articular; no entanto, ao final do crescimento essa estrutura funciona apenas como cartilagem articular.[3]

Durante o período de crescimento, a CAM é composta de cinco camadas. A camada mais superficial é chamada *camada fibrosa*. Ela é encontrada adjacente à cavidade articular e forma a superfície funcional mais externa. A segunda, *camada proliferativa*, é formada por células indiferenciadas, com formato poligonal, que darão origem aos condroblastos e fibroblastos. Na terceira, a *camada de transição*, as células possuem formato achatado e citoplasma comprimido. A quarta é chamada de *camada madura* e nela os condrócitos bem diferenciados possuem formato ovóide e polaridade celular. Na quinta ou *camada hipertrófica,* os condrócitos se tornam hipertróficos, morrem, têm seu citoplasma evacuado e a matriz de cartilagem é mineralizada. Ao final do crescimento, a estrutura organizacional da CAM se torna similar à cartilagem articular dos ossos longos, e consiste em três camadas: fibrosa, proliferativa e madura.[4]

Dentre os componentes celulares e moleculares da CAM, estão os condrócitos, fibrilas colágenas, proteoglicanos e glicoproteínas que formam a matriz extracelular (MEC). O colágeno tipo II é o principal componente da MEC da cartilagem articular, sendo responsável pela dureza, força de tensão e resistência a compressão desse tecido. Os proteoglicanos, do tipo agrecano, são o segundo maior componente da CAM e estão conectados a uma cadeia de ácido hialurônico formando agregados que

constituem uma parte importante da matriz. Estes agregados são muito hidrofílicos e estão entrelaçados por toda a rede de colágeno. As interações físicas entre as fibrilas de colágeno e os proteoglicanos podem ocorrer de duas formas: primeiramente, as cargas negativas dos grupos de proteoglicanos podem atrair as cargas positivas do colágeno e segundo, existe uma interação friccional entre a fina rede de colágeno e o agrecano, sem que haja ligação covalente. Como estes conjuntos tendem a reter água, a matriz se expande e a tensão nas fibrilas colágenas neutraliza a pressão proveniente do inchaço dos agregados de proteoglicanos.[5]

Os condrócitos são importantes células do tecido articular, responsáveis pela síntese, incorporação e organização de componentes da MEC. O equilíbrio apropriado dessas funções resulta na manutenção da cartilagem e suas funções biológicas ao longo da vida. Mudanças mecânicas no ambiente dessas células são capazes de alterar as atividades anabólicas e catabólicas, levando à doenças degenerativas da cartilagem.[5]

As desordens temporomandibulares (DTM) são um conjunto de problemas clínicos que envolvem os músculos da mastigação, as ATMs com suas estruturas associadas, ou ambas.[6] Seus sintomas característicos incluem dor à palpação muscular e/ou articular, função limitada e ruídos articulares. Segundo revisão sistemática da literatura, a prevalência desses sintomas varia consideravelmente dependendo do estudo analisado, atingindo 9 a 16% da população se forem adotados os Critérios Diagnósticos de Pesquisa em Disfunção Temporomandibular (RDC/TMD).[7]

Em geral, as DTMs podem ser divididas em desordens articulares e não articulares. Essas desordens são sinônimos de condições intracapsulares e extracapsulares, respectivamente.[8]

A osteoartrite (OA) é a desordem temporomandibular de origem articular que mais acomete a ATM. Ela é caracterizada pela degeneração dos tecidos mineralizados e não mineralizados ao redor da articulação podendo afetar a cartilagem, o osso subcondral e a membrana sinovial causando remodelação, abrasão da cartilagem articular e deterioração. É estimado que 8 a 16% da população mundial sofra dessa doença na ATM.[9]

A osteoartrite da articulação temporomandibular (OAATM) possui uma etiologia complexa e multifatorial. Segundo a Academia Americana de Dor Orofacial, a má oclusão é um fator de risco por provocar deslocamento da cabeça da mandíbula, causando áreas de trauma na CAM e um processo inflamatório contínuo. Esse trauma mecânico inicia uma série de mudanças biomoleculares nos tecidos da articulação estimulando uma resposta imune, através da liberação de vários mediadores inflamatórios da MEC.[9]

Dentro desse contexto, ocorreram progressos no estudo dos mecanismos moleculares que envolvem a artrite degenerativa das ATMs. Foi demonstrado que a sobrecarga mecânica é capaz de desencadear uma cascata de eventos que envolvem a produção e liberação de radicais livres, citocinas, catabólitos, neuropeptídios e enzimas que processam a MEC, o que pode resultar em alterações importantes na CAM.[10]

Existem vários fatores envolvidos na degeneração da CAM diante da OA, como a elevada expressão e atividade de enzimas proteolíticas. As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas normalmente envolvidas na formação, remodelamento e reparo dos tecidos. Nessa família de enzimas estão as colagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), as gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelisina-1 (MMP-3) e MMP tipo I de membrana (MMP-14).[11] A MMP-3 é secretada por fibroblastos, células sinoviais e condrócitos e atua como a protease mais importante na cartilagem. Além de degradar a maior parte dos componentes da MEC, como o agrecano, a membrana basal, elastina, laminina, e outros, também ativa a MMP-9 (gelatinase B), que usa os colágenos tipo II, IV e V como substrato e desempenha papel relevante no desenvolvimento da OA.[12]

Os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) são uma família de proteínas presentes no meio extracelular responsáveis pela regulação endógena das MMPs. O genoma humano possui quatro genes codificadores das TIMPs designados como TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. Seu tamanho varia de 22 a 28 kDa, dependendo da presença e do grau de glicosilação. Os 4 tipos de TIMPs existentes são 40% idênticos entre si e possuem dois domínios estruturais: um domínio N-terminal, que possui a propriedade da atividade inibitória das MMPs e, um domínio C-terminal, importante na complexa formação das pro-enzimas. As TIMPs podem ser reguladas

a nível transcripcional por várias citocinas e fatores de crescimento, resultando em expressão induzida, constitutiva ou tecido-específica. Apesar de sua proximidade estrutural, as TIMPs diferem em diversos aspectos incluindo solubilidade, interação com as MMPs e regulação da expressão.[13]

As TIMPs são moléculas bem reconhecidas pelo seu papel na remodelação da MEC. Os quatro tipos de TIMPs possuem a capacidade de regular a atividade das 23 MMPs existentes. A homeostase dos tecidos é atingida através de um equilíbrio entre a atividade proteolítica das MMPs e a expressão de TIMP. Níveis elevados de TIMPs/MMPs podem resultar em doenças associadas com alterações da MEC, inflamação, crescimento e migração celular, como artrite, doenças cardiovasculares, câncer, doenças pulmonares, desordens neurológicas, nefrites e ulceração tecidual.[14]

A TIMP-1 foi a primeira molécula reguladora de MMPs descoberta. Ela está presente de forma solúvel na superfície celular dos tecidos e sua expressão nas células é regulada por fatores de crescimento e citocinas. Além da sua atividade reguladora das proteases que processam a MEC, a TIMP-1 atua como molécula sinalizadora com atividades similares à citocinas, influenciando vários processos biológicos que incluem crescimento celular, apoptose, diferenciação, angiogênese e oncogênese. Essa enzima possui a capacidade de se ligar a receptores de membrana específicos, induzindo respostas celulares por diferentes vias de sinalização.[15] Em termos de inibição de MMP, o domínio N-terminal da TIMP-1 possui alta especificidade à MMP-9, estando a sua mudança de expressão associada aos processos inflamatórios que ocorrem na OA.[16]

Modelos animais de OAATM são uma importante abordagem no intuito de investigar a etiologia e patogênese da doença já que a obtenção de amostras clínicas de pacientes com OAATM representa um grande desafio para pesquisa. Trabalhos anteriores testaram como a oclusão anormal, com alteração na distribuição da força oclusal ou interferência na via oclusal livre, seria biomecanicamente prejudicial à ATM. Os resultados demonstraram presença de inflamação e remodelação da cartilagem e osso subcondral durante os estágios primários da OA, além da mudança de expressão de MMPS, TIMPs, proteoglicanos, citocinas e vias de sinalização, associadas ao deslocamento da cabeça da mandíbula, trauma e cargas excessivas resultantes das

más oclusões. Esse é um possível caminho para melhor entendimento do mecanismo envolvido no surgimento e progressão da OAATM.[17]

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar aspectos morfológicos e a expressão de TIMP-1 em CAM de ratos em condição de má oclusão experimental em dois tempos experimentais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar e identificar os aspectos morfológicos de normalidade na CAM de animais em idade adulta.

2. Analisar os aspectos morfológicos da CAM em animais em idade adulta submetidos a má oclusão por duas e quatro semanas.

3. Analisar a expressão de TIMP-1 nas camadas fibrosa, proliferativa e madura da CAM em animais em idade adulta submetidos a má oclusão por duas e quatro semanas.

4. Caracterizar o padrão de expressão de TIMP-1 nas camadas fibrosa, proliferativa e madura nos animais em idade adulta sem alteração na oclusão.

5. Comparar os aspectos morfológicos e o padrão de expressão de TIMP-1 entre os animais com e sem alteração na oclusão por duas e quatro semanas.

3 RESULTADOS

3.1 ARTIGO: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA CARTILAGEM ARTICULAR DA MANDÍBULA E MUDANÇAS NA EXPRESSÃO DE TIMP-1 EM CONDIÇÃO DE MÁ OCLUSÃO EXPERIMENTAL

Carolina Brioschi Mathias [a], Willian Grassi Bautz [b], Leticia Nogueira da Gama de Souza [c]

[a] Universidade Federal do Espírito Santo, Ufes, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brasil. CEP 29043-900. *E-mail:* carolbrioschi@yahoo.com.br

[b] Universidade Federal do Espírito Santo, Ufes, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brasil. CEP 29043-900. *E-mail:* willian.bautz@ufes.br

[c] Universidade Federal do Espírito Santo, Ufes, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brasil. CEP 29043-900. *E-mail:* leticia.souza@ufes.br

Autor de correspondência:

Carolina Brioschi Mathias

Endereço: Rua São Paulo, 2202, apto 301, Itapuã, Vila Velha, ES, Brasil. CEP 29101-502.

E-mail: carolbrioschi@yahoo.com.br

Telefone: 55 27 9-9224-6626

---

[2]Artigo elaborado de acordo com as normas técnicas da American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.

Resumo

Introdução: A osteoartrite (OA) é caracterizada pela degradação da cartilagem articular e sua ocorrência na articulação temporomandibular (ATM) pode estar associada à presença de desordens oclusais. Os objetivos da pesquisa foram investigar as alterações morfológicas e o padrão de expressão de TIMP-1 na cartilagem articular da mandíbula (CAM) em condição de má oclusão experimental.

Métodos: Foram utilizadas 24 fêmeas de ratos Wistar com 8 semanas de vida divididas em grupo controle e tratado, com dois tempos experimentais (2 e 4 semanas). Más oclusões sagitais foram criadas ortodonticamente, causando movimentação mesial dos primeiros molares e distalização dos terceiros unilateralmente e em lados opostos das arcadas. Cortes sagitais das ATMs foram obtidos para processamento histológico. Imuno-histoquímica foi realizada para TIMP-1 e as células marcadas foram contadas e analisadas estatisticamente.

Resultados: Animais tratados por 2 e 4 semanas apresentaram alterações degenerativas na CAM características de OA. Os principais achados foram espessamento do terço posterior, desarranjo das camadas, atividade osteoclástica e formação de osteófito. Entre os aspectos celulares, presença de condrócitos com núcleo condensado e redução do citoplasma foram observados. A expressão de TIMP-1 nos animais controle foi observada apenas na camada madura. Já nos tratados, células imunopositivas foram encontradas nas camadas proliferativa e madura, sendo que nos animais tratados por 2 semanas o terço posterior apresentou maior número de células imunomarcadas do que o grupo controle ($P<0.05$).

Conclusões: O estudo demonstrou que uma desordem oclusal pode levar a respostas degenerativas na CAM acompanhadas de alterações na expressão de TIMP-1.

Palavras-chave: Articulacão Temporomandibular, Osteoartrite, Má Oclusão, Inibidor tecidual de Metaloproteinase-1.

3.1.1 Introdução

A articulação temporomandibular (ATM) é uma articulação sinovial que executa os movimentos mais complexos do corpo humano. Ainda, é o único sistema articular com um ponto terminal rígido de fechamento, os dentes, o que estabelece uma interdependência de formação estrutural e estabilidade funcional entre a dentição e a ATM. Assim, é de se esperar que alterações como perdas dentárias, restaurações incorretas, traumas, doenças articulares e outros possam gerar modificações adaptativas nessas estruturas.[1]

O deslocamento da cabeça da mandíbula, que ocorre nas alterações oclusais, pode causar mudanças biomecânicas na ATM, resultando em sobrecarga nos tecidos articulares. Como qualquer cartilagem articular, a cartilagem articular da mandíbula (CAM) é principalmente uma barreira para o estresse biomecânico. Apesar de sua habilidade de remodelação, quando submetida a cargas não fisiológicas, sua adaptação pode ser não funcional e causar alterações estruturais.[2] Essas alterações podem evoluir para a osteoartrite (OA), caracterizada pela degradação e perda da CAM, aumento da espessura do platô ósseo com formação de osteófitos e remodelação óssea.[3] Estudos epidemiológicos demonstraram que 8 a 16% da população sofrem de OA da ATM (OAATM).[4]

Em circunstâncias normais, as células da CAM mantêm um equilíbrio entre atividades anabólicas e catabólicas e expressam diferentes moléculas que participam do processo de remodelação da ATM em resposta às demandas funcionais. Dentro desse contexto, estão as enzimas proteolíticas da família das metaloproteinases da matriz (MMPs). No âmbito da OA, a MMP-3 atua como a protease mais importante no processamento da cartilagem, degradando importantes componentes da matriz extracelular (MEC). Além disso, ativa a MMP-9, que utiliza os colágenos do tipo II, IV e V como substrato, desempenhando relevante papel no desenvolvimento e progressão da doença.[5]

A atividade das MMPs é precisamente regulada sob condições fisiológicas por inibidores endógenos, denominados inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz (TIMPs). Os quatro tipos de TIMPs existentes (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4) podem se ligar às MMPs com estequiometria de 1:1. Essas moléculas são

normalmente encontradas no meio extracelular e possuem identidade estrutural similar. Um desequilíbrio nos níveis de TIMPs e MMPs tem sido considerado fator chave no desenvolvimento e progressão das desordens articulares.[6]

Embora as TIMPs tenham sido quase que exclusivamente examinadas na sua função como inibidoras de MMPs, evidências científicas têm claramente indicado que essas enzimas possuem atividades biológicas adicionais, como a sinalização celular. Essas atividades, que são similares às de citocinas, incluem a regulação da proliferação celular, apoptose, diferenciação e angiogênese.[7]

Trabalhos anteriores observaram que situações de sobrecargas articulares resultam em ativação de sinais intracelulares e consequente síntese de MMPs e TIMPs.[8] A TIMP-1 está presente de forma solúvel, na superfície celular, sendo ativada em processos biológicos importantes, como crescimento celular, apoptose, diferenciação, angiogênese e oncogênese. A síntese e atividade dessa molécula dependem do tipo celular e do contexto biológico no qual ela é expressa, contudo, pouco se conhece a respeito dos mecanismos moleculares que envolvem as atividades da TIMP-1 nas diferentes células em condições fisiológicas e patológicas. A propriedade da TIMP-1 de atuar como citocina e reguladora das proteases da matriz evidencia seu papel crucial na comunicação entre o meio intracelular e a MEC.[9] Em termos de especificidade, a TIMP-1 se liga com alta afinidade à MMP-9 e, portanto, mudanças na sua expressão foram associadas aos processos inflamatórios que ocorrem na OAATM.[10,11]

Assim, no intuito de melhor elucidar as alterações que ocorrem na ATM diante de uma desordem oclusal, o presente estudo buscou avaliar os aspectos morfológicos e a expressão de TIMP-1 em CAM de ratos em condição de má oclusão experimental.

3.1.2 Materiais e métodos

Para a realização do trabalho, foram utilizadas 24 fêmeas de ratos da raça Wistar com 8 semanas de vida. Os animais foram obtidos no Biotério do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo. Todos os procedimentos passaram pela aprovação na Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA), sob o número de protocolo 50/2016 e foram realizados de acordo com suas diretrizes. Os ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=6), sendo 2 grupos tratados e 2 grupos controle. Nos grupos tratados, foram criadas más oclusões sagitais como previamente descrito na literatura:[3,5] Elásticos ortodônticos (1/8#; Morelli®, Sorocaba-SP) foram inseridos entre o primeiro e segundo molares superiores esquerdos e entre o primeiro e segundo molares inferiores direitos, de modo que a força do elástico movimentasse gradualmente os primeiros molares mesialmente, criando uma separação de aproximadamente 0,8 mm após 7 dias da instalação. Passado esse período, os elásticos foram substituídos por cimento resinoso autoadesivo de polimerização dual (MonoCem™; Shofu, San Marcos, CA), tomando-se cuidado para que a resina não contactasse os dentes antagonistas, mantendo a separação dentária em posição. Finalizado o prazo de 2 semanas, o mesmo método foi utilizado para movimentar distalmente os terceiros molares superior esquerdo e inferior direito. Dessa forma, foi criada uma má oclusão na qual os molares foram deslocados de suas posições originais, não havendo intercuspidação e engrenamento oclusal entre as arcadas superior e inferior (Fig 1). Nos grupos controle, todos os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos dos grupos experimentais, exceto no que diz respeito a instalação do sistema para causar a desordem oclusal. Os animais foram eutanasiados ao final da segunda (subgrupo T2: animais com 12 semanas de vida) ou quarta semana (subgrupo T4: animais com 14 semanas de vida) após a inserção do cimento resinoso na mesial dos terceiros molares.

Durante todo o processo, os animais foram mantidos em condições de humidade, dieta e temperatura controladas. O método anestésico empregado foi por administração parenteral de 0,16 ml de Cetamina a 10%, associada ao relaxante muscular Xilasina 1%, na dose de 0,1ml. Para eutanásia, a dose utilizada foi 3 vezes maior que a dose anestésica. A Cetamina foi utilizada devido à sua longa vida útil e rápida atuação em roedores.[12]

Após a eutanásia, os blocos de tecido contendo as ATMs direita e esquerda dos animais foram dissecados e fixados em solução de paraformaldeído a 4% com pH 7,4 por 12 horas a 4ºC e então descalcificados com solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10% com tampão fosfato 0,1M e pH 7,4 por 6 semanas. Após a descalcificação, os tecidos ao redor das ATMs foram removidos, e o ramo da mandíbula foi exposto. As ATMs foram então desidratadas em uma sequência de etanol e embebidas em parafina. Secções seriadas de 5 µm foram obtidas no plano sagital das ATMs com auxílio de micrótomo (RM2135; Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha).

Os cortes histológicos foram condicionados em lâminas silanizadas Starfrost® (Knittel; Brownschweig, Alemanha) e submetidos a técnica de coloração com hematoxilina-eosina para análise de aspectos estruturais.

Para análise da expressão de TIMP-1, os cortes foram submetidos ao método da imunoperoxidase. O anticorpo utilizado foi o anti-TIMP1 gerado em coelhos com diluição inicial de 1:100 (TIMP1 antibody orb195994, BIORBYT®). A imunodetecção foi realizada com o Sistema Reveal (Spring/Biogen SPB-999) utilizando 3,3'-diaminobenzidina como o cromogéno. As secções foram contrastadas com Hematoxilina de Mayer. Tampão citrato de pH 6,0 foi usado durante 15 minutos à 93°C durante recuperação antigênica. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário durante a noite numa câmara úmida mantida a 4°C. A seguir, a peroxidase endógena foi consumida por incubação durante 10 minutos com 3% de peróxido de hidrogênio em temperatura ambiente. Bloqueio de proteína foi realizado por 10 minutos, também em temperatura ambiente. Subsequentemente, as amostras foram incubadas com sistema secundário de detecção de anticorpo de acordo com as instruções do fabricante. Os cortes foram lavados cuidadosamente com solução salina tamponada com fosfato durante todo o processo. As lâminas foram montadas com DPX (Sigma-Aldrich®; Saint Louis, MI) e examinadas ao microscópio. Controle negativo (omissão do anticorpo primário) foi incluído.

As lâminas imunomarcadas foram analisadas de forma cega e por um único investigador previamente calibrado. Para a leitura dos cortes e aquisição de imagens, foi utilizado microscópio PrimoStar Zeiss com uma câmera digital acoplada Zeiss AxioCam ERC5s (Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha) e programa de imagens Axio

Vision 4.8 Release 4.8.2 (Carl Zeiss Vision GmbH, Alemanha). A face articular da CAM, definida como a área entre os pontos de inserção anterior e posterior do disco articular à cabeça da mandíbula, foi dividida em partes anterior, média e posterior (Fig. 2 A). De cada parte, foi selecionada uma secção incluindo as camadas fibrosa, proliferativa e madura, além de parte do osso subcondral (Fig. 2 B). Para a análise quantitativa da expressão de TIMP-1, foram capturadas fotomicrografias com dimensões de 433,57x325,12mm (objetiva de 100X) de cada parte da CAM e essas imagens foram analisadas utilizando-se o programa *ImageJ1* (SciJava) para se determinar o número de células marcadas pela enzima nas diferentes camadas.

Para as análises estatísticas, foi utilizado o software GraphPad (California, EUA). Na análise comparativa dos achados morfológicos entre os diferentes grupos tratados, foi aplicado o teste Qui Quadrado. Já para análise de TIMP-1, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney na comparação entre os grupos controle e tratados nos diferentes tempos experimentais. Valores de *P* foram considerados significantes quando menores que 0.05.

3.1.3 Resultados

Quanto aos aspectos estruturais observados, os animais dos grupos controles de 2 e 4 semanas apresentaram a face articular com aspectos de normalidade, e as camadas fibrosa, proliferativa e madura da CAM podiam ser claramente distinguidas. A MEC estava distribuída igualmente, sendo possível visualizar fibroblastos e condrócitos sem alterações e presentes de forma homogênea em suas camadas (Figs. 3 e 4; A, B e C).

Já nos animais dos grupos tratados, foram observadas alterações características da OA. No subgrupo T2 os seguintes achados foram encontrados: aparente redução do espaço infra-discal com provável adesão entre o disco articular e a CAM (Fig. 3, D, cabeças de setas); aparente espessamento do terço posterior (Fig 3, E); aparente espessamento da camada fibrosa (Fig. 3, F, *); espessamento dos terços posterior e médio da CAM, respectivamente (Fig. 3, G e H); desarranjo da CAM na interface com o osso subjacente (Fig. 3, I, elipse); presença de osteoclastos com sugestão de reabsorção óssea (Fig. 3, J, cabeças de setas); presença de condrócitos com núcleo condensado e redução do citoplasma (Fig. 3, K, cabeças de setas); e fibrilação da face articular (Fig. 3, L, cabeças de setas).

No subgrupo T4 foram observados: depósito de componente eosinofílico na cavidade articular (Fig. 4, D, elipse); adesão do disco articular à CAM (Fig.4, E, cabeças de setas); aumento aparente da densidade de células da camada proliferativa (Fig. 4, F, *); desorganização da camada proliferativa, com aumento na densidade celular (Fig. 4, G, *); redução na densidade das células na camada fibrosa (Fig. 4, H, *); presença de osteófito (Fig. 4, I, elipse); condrócitos com núcleos eosinofílicos (Fig. 4, J, cabeças de seta); defeito ósseo com desarranjo das camadas profundas da CAM (Fig. 4, K, *), invasão vascular na CAM (fig. , L, cabeças de setas).

Dentre os diversos aspectos morfológicos observados, alguns estavam presentes em um percentual maior. Em relação ao tempo experimental de 2 semanas, houve destaque para: espessamento dos terços posterior (83,33%) e médio (66,66%) da CAM; aumento da espessura da camada fibrosa (83,33%) e atividade osteoclástica com reabsorção óssea (66,66%). No subgrupo T4, foram mais evidenciados o aumento na espessura das camadas fibrosa (100%) e proliferativa (66,66%), espessamento do terço posterior da CAM (83,33%) e atividade osteoclástica com

reabsorção óssea (66,66%). A tabela I resume os achados morfológicos identificados nos animais tratados por 2 e 4 semanas.

Na análise qualitativa de TIMP-1, foi possível observar correspondências entre algumas alterações teciduais e a presença da enzima nos animais do grupo tratado, além de alterações nas camadas que expressavam a enzima. Os principais achados foram: aumento da expressão em condrócitos (Fig. 5, A, *) e na MEC em áreas de desarranjo da CAM, com aparente invasão da camada proliferativa nas camadas subjacentes (Fig. 5, B, cabeça de seta); imunomarcação em áreas de espessamento das camadas proliferativa e madura (Fig. 5, C, º, *); expressão da enzima na MEC em área de desarranjo da camada proliferativa (Fig. 5, D, elipse); imunomarcação de áreas com atividade osteoclástica (Fig. 5, E, cabeças de seta) e expressão da TIMP-1 em área de desorganização da CAM às custas da camada proliferativa e condrócitos com alterações morfológicas (Fig. 5, F, cabeça de seta).

Ainda em relação a análise quanlitativa da enzima, foi possível observar que nos animais controle de 2 e 4 semanas a contagem ficou restrita aos condrócitos da camada madura (Fig. 6, A animal de 2 semanas; C, animal de 4 semanas). Já nos animais tratados, células imunopositivas foram identificadas nas camadas proliferativa e madura (Fig. 6, B e D).

Na análise quantitativa, quando os grupos experimentais foram comparados aos seus controles, houve aumento no número de células com expressão de TIMP-1 no terço posterior da CAM de animais tratados por 2 semanas (fig. 6, G $P<0.05$). Esse mesmo dado não foi encontrado nos terços anterior e médio (Fig. 6, E e F $P>0.05$). Embora os níveis de células marcadas pela TIMP-1 apresentaram aparente aumento nos animais tratados por 4 semanas, a análise estatística demonstrou que não houve diferença na comparação com os animais controle nos diferentes terços avaliados (Fig. 6, H, I e J). A tabela II resume os dados da distribuição das células marcadas nos diferentes tempos experimentais.

3.2.4 Discussão

Os resultados obtidos sugerem a presença de alterações degenerativas na CAM após o estabelecimento de uma desordem oclusal, o que demonstra um real desequilíbrio no microambiente da ATM. Esses achados estão em concordância com estudos anteriores.[3,5,11,13,14,15,16,17,18]

A alteração de maior incidência no grupo T2 foi o espessamento do terço posterior da CAM. Em condição de oclusão normal, a cabeça da mandíbula localiza-se no centro da fossa mandibular. A presença de uma má oclusão pode causar seu deslocamento posterior, resultando em sobrecarga dos tecidos da região durante o movimento de fechamento mandibular.[2] Assim, é possível indicar um efeito biomecânico anormal criado pela instalação da desordem oclusal nessa região da CAM. Sua provável resposta é o desenvolvimento de um processo de adaptação à nova condição fisiológica, mas que pode evoluir para as alterações degenerativas encontradas nos animais tratados.

Uma outra alteração também muito presente foi o aumento na espessura das camadas fibrosa e madura em toda a extensão da CAM em animais do grupo T4. Estudo anterior descreveu aumento da espessura da CAM em 16 de 72 animais tratados através de desordem oclusal sagital em diferentes tempos experimentais. Ainda, os autores mencionam que o aumento na espessura foi primordialmente na camada madura, seguido pela camada proliferativa, sendo mais visível no terço posterior da CAM.[13] Pode-se sugerir que o aumento represente uma lesão degenerativa da cartilagem, mas também não excluindo a possibilidade de ser uma resposta de regeneração, o que com o tempo demonstraria o potencial de reparo dos tecidos envolvidos.[5]

Ao compararmos os diferentes tempos experimentais dos animais tratados, embora a análise estatística não tenha apresentado diferenças, as alterações características da OA foram mais evidentes no subgrupo T2. Provavelmente, houve uma resposta adaptativa inicial de remodelação da cartilagem, o que já foi previamente reportado.[11] Mas ainda não se pode afirmar que essas alterações de fato representam uma adaptação diante de uma nova posição mandibular ou se houve regressão de lesões prévias para uma mudança dentoalveolar.

É reconhecido que a CAM possui a capacidade de se remodelar durante a vida toda para que se adapte às mudanças em resposta à carga mecânica diante de demandas funcionais, como oclusão e mastigação.[19,20] A MEC fornece à cartilagem articular propriedades biomecânicas únicas, e por isso, a degradação de seus componentes pode levar a doenças crônicas.[21] Normalmente, a oclusão de máxima intercuspidação suporta as forças mastigatórias porque pode distribui-las pelas áreas de contato dentárias.[22] Nos animais tratados, não era possível observar a relação cúspide/fossa ou estabilidade da oclusão habitual. Essa sobrecarga oclusal incidente sobre as ATMs pode desencadear as alterações encontradas no estudo.

As TIMPs são moléculas bem reconhecidas pelo seu papel na remodelação da MEC, por serem inibidoras naturais das MMPs e por suas atividades sinalizadoras que influenciam vários processos biológicos. A secreção de TIMP-1 pode estar relacionada intimamente com a mudança nas quantidades de MMP-9 e MMP-3, enzimas que degradam componentes importantes na manutenção da integridade da CAM, como o colágeno tipo II.[3] O padrão de expressão de TIMP-1 nos animais tratados foi encontrado alterado quando comparado com os animais controle. Enquanto que nos animais que não sofreram a desordem oclusal a enzima ficou restrita a camada madura, nos animais tratados sua expressão avançou para outras camadas e também para a MEC. Também foi observada a expressão da molécula em áreas de alterações estruturais da CAM, com aumento de células marcadas em regiões de espessamento e desarranjo das camadas, atividade osteoclástica e em condrócitos morfologicamente modificados. Pode-se sugerir que o aumento dos níveis de TIMP-1 está relacionado à remodelação tecidual, seja para degeneração ou adaptação da cartilagem à nova posição mandibular.

Ainda, ao avaliarmos a quantidade de células marcadas nos animais tratados por 2 e 4 semanas, observamos que a expressão foi maior no terço posterior da CAM dos animais do subgrupo T2, quando comparados aos animais controle. Essa diferença de marcação celular para a região posterior da CAM pode ser reflexo do deslocamento da cabeça da mandíbula mediante a instalação da desordem oclusal, causando assim, um aumento da carga sobre as células e tecidos. Sabe-se que em condições normais esse terço não é funcional, sendo a carga mastigatória absorvida pelos terços anterior e médio da CAM.[2] Logo, pode-se sugerir que a resposta das células do terço posterior para a nova condição foi em parte construída com maior produção de TIMP-1.

Contudo, com o tempo o processo continuado de sobrecarga pode levar a uma adaptação e remodelação teciduais, o que pode explicar o fato do subgrupo T4 apresentar expressão da enzima de maneira semelhante quando comparados os animais controle e tratado. Usando modelo animal de OA no joelho, Le Graverand e colaboradores[23] analisaram as alterações celulares e moleculares ocorridas em 2 tempos do estabelecimento da doença (3 e 8 semanas), tendo concluído que os níveis de TIMP-1 estavam significativamente aumentados nos estágios iniciais (3 semanas).

A função da TIMP-1 na patogênese de doenças inflamatórias ainda não é completamente conhecida. Estudo anterior comparou a quantidade dessa enzima no líquido sinovial de pacientes com OA de joelho ativa e pacientes em controle. O nível de TIMP-1 em pacientes em estágio avançado da doença foi muito maior, demonstrando uma correlação positiva entre a expressão de TIMP-1 e a severidade da OA. Os autores concluíram que o diagnóstico de progressão da doença pode ser realizado através da detecção do nível de expressão de TIMP-1 na membrana sinovial dos pacientes.[24]

Trabalho realizado em modelo animal de OA em joelho e quadril, utilizou medicamento à base de Tricostatina A (efetivo inibidor de deacetilases de histonas em mamíferos). Após o uso do medicamento, os autores observaram que a expressão de TIMP-1 foi aumentada nos ratos com OA do joelho e do quadril quando comparados aos seus controles. Ainda, não foi detectado efeito direto na expressão de MMP-1, MMP-3 e MMP-13. Esses achados sugerem que a substância utilizada imprimiu um aumento nos níveis de TIMP-1, ao invés de transcrição reduzida de MMPs, o que poderia ser considerado um efeito protetor para os tecidos acometidos pela doença.[25]

Quando analisamos os resultados encontrados, devemos considerar que, embora existam evidências que sugerem o papel da sobrecarga oclusal no estabelecimento de alterações estruturais que caracterizam a OA, existem diferenças anatômicas e fisiológicas entre o modelo animal e os pacientes. De qualquer forma, os modelos animais de OAATM são reconhecidamente ferramentas eficazes para o estudo das bases biológicas envolvidas na patologia, etiologia e progressão da doenç**a.**

3.2.5 Conclusão

A má oclusão criada experimentalmente foi capaz de induzir uma resposta na CAM que promoveu alterações morfológicas, acompanhadas de mudanças na expressão de TIMP-1. Esses resultados demonstram que quando a oclusão é modificada, os tecidos sofrem alterações em diferentes proporções, o que com o tempo pode levar ao estabelecimento da OA.

3.2.6 Financiamento

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do espirito Santo (FAPES Universal 06/2014 Processo número 67659870).

Referências

1. Wang, X. D., Zhang, J. N., Gan, Y. H., & Zhou, Y. H. Current understanding of pathogenesis and treatment of TMJ osteoarthritis. *Journal of dental research* 2015; *94*(5), 666-673.

2. Cholasueksa, P., Warita, H., & Soma, K. Alterations of the rat temporomandibular joint in functional posterior displacement of the mandible. *The Angle Orthodontist* 2004; *74*(5), 677-683.

3. Wang, G. W., Wang, M. Q., Wang, X. J., Yu, S. B., Liu, X. D., & Jiao, K. Changes in the expression of MMP-3, MMP-9, TIMP-1 and aggrecan in the condylar cartilage of rats induced by experimentally created disordered occlusion. *Archives of oral biology* 2010; *55*(11), 887-895.

4. Kalladka, M., Quek, S., Heir, G., Eliav, E., Mupparapu, M., & Viswanath, A. Temporomandibular joint osteoarthritis: diagnosis and long-term conservative management: a topic review. *The Journal of Indian Prosthodontic Society* 2014; *14*(1), 6-15.

5. Kuang, B., Dai, J., Wang, Q. Y., Song, R., Jiao, K., Zhang, J., ... & Wang, M. Q. Combined degenerative and regenerative remodeling responses of the mandibular condyle to experimentally induced disordered occlusion. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 2013; *143*(1), 69-76.

6. Brew, K., & Nagase, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research 2010*; *1803*(1), 55-71.

7. Stetler-Stevenson, W. G. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Science signaling* 2008; *1*(27), re6-re6.

8. Greene, C. S., & Laskin, D. M. Temporomandibular disorders: moving from a dentally based to a medically based model. *Journal of dental research* 2000; *79*(10), 1736-1739.

9. Ries, C. Cytokine functions of TIMP-1. *Cellular and molecular life sciences* 2014; *71*(4), 659-672.

10. Jiao, K., Wang, M. Q., Niu, L. N., Dai, J., Yu, S. B., & Liu, X. D. Mandibular condylar cartilage response to moving 2 molars in rats. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 2010; *137*(4), 460-e1.

11. Yu, S., Xing, X., Jiao, K., Sun, L., Liu, L., & Wang, M. Changes in the expression of aromatase, estrogen receptor α and β in mandibular condylar cartilage of rats induced by disordered occlusion. *BMC musculoskeletal disorders* 2012; *13*(1), 190.

12. Underwood, W., Anthony, R., Gwaltney-Brant, S., Poison, A. S. P. C. A., & Meyer, R. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association 2013.

13. Wang, Q. Y., Dai, J., Kuang, B., Zhang, J., Yu, S. B., Duan, Y. Z., & Wang, M. Q. Osteochondral angiogenesis in rat mandibular condyles with osteoarthritis-like changes. *Archives of oral biology* 2012; *57*(6), 620-629.

14. Wang, Y. L., Zhang, J., Zhang, M., Lu, L., Wang, X., Guo, M., ... & Wang, M. Q. Cartilage degradation in temporomandibular joint induced by unilateral anterior crossbite prosthesis. *Oral diseases* 2014; *20*(3), 301-306.

15. Li, W., Wu, M., Jiang, S., Ding, W., Luo, Q., & Shi, J. (2014). Expression of ADAMTs-5 and TIMP-3 in the condylar cartilage of rats induced by experimentally created osteoarthritis. *Archives of oral biology*, *59*(5), 524-529.

16. Jiao, K., Wang, M. Q., Niu, L. N., Dai, J., Yu, S. B., & Liu, X. D. Mandibular condylar cartilage response to moving 2 molars in rats. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 2010; *137*(4), 460-e1.

17. Yu, S., Sun, L., Liu, L., Jiao, K., & Wang, M. Differential expression of IGF1, IGFR1 and IGFBP3 in mandibular condylar cartilage between male and female rats applied with malocclusion. *Journal of oral rehabilitation* 2012; *39*(10), 727-736.

18. Wang, M., Sun, L., Yu, S. B., Liu, X., Jiao, K., Wang, G. W., ... & He, J. J. Degenerative changes in rat condylar cartilage induced by non-matching occlusion created by scattered orthodontic teeth-moving. *CRANIO®* 2012; *30*(4), 286-292.

19. Mongini, F. Condylar remodeling after occlusal therapy. *The Journal of prosthetic dentistry 1980*, *43*(5), 568-577.

20. Silver, F. H., Bradica, G., & Tria, A. (2004). Do changes in the mechanical properties of articular cartilage promote catabolic destruction of cartilage and osteoarthritis?. *Matrix Biology*, *23*(7), 467-476.

21. Goldring, M. B., & Marcu, K. B. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy* 2009; *11*(3), 224.

22. Hiiemäe, K. M., & Ardran, G. M. A cinefluorographic study of mandibular movement during feeding in the rat (Rattus norvegicus). *Journal of Zoology* 1968; *154*(2), 139-154.

23. Le Graverand, M. P. H., Vignon, E., Otterness, I. G., & Hart, D. A. Early changes in lapine menisci during osteoarthritis development Part II: Molecular alterations. *Osteoarthritis and cartilage* 2001 *9*(1), 65-72.

24. Li, X., Fu, X., Gao, Y., Li, H., Wang, W., & Shen, Y. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and B-cell lymphoma-2 in the synovial membrane in patients with knee osteoarthritis. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2018 *15*(1), 885-889.

25. Qu, H., Li, J., Wu, L. D., & Chen, W. P. Trichostatin A increases the TIMP-1/MMP ratio to protect against osteoarthritis in an animal model of the disease. *Molecular medicine reports* 2016 *14*(3), 2423-2430.

Figuras

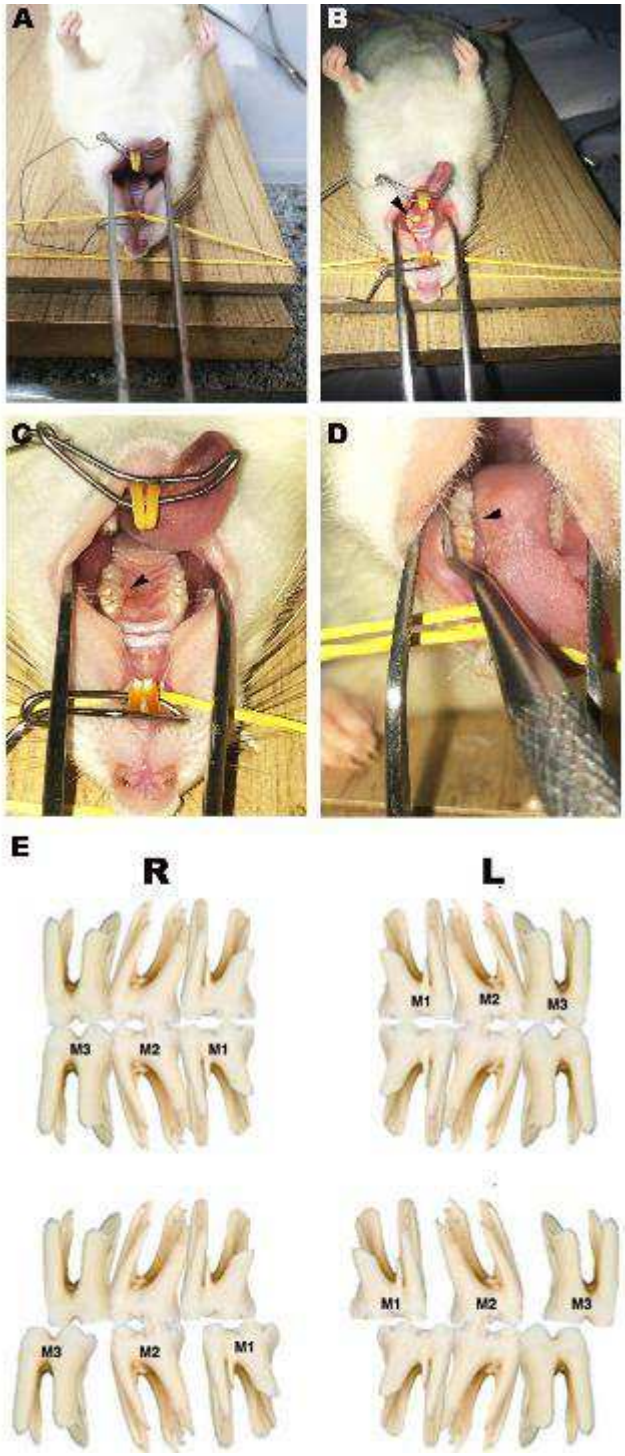

Fig 1. Manipulação dos ratos e esquema do desajuste oclusal: A, instalação imediata do elástico interproximal e B, aspecto após 7 dias. C-D representam a estabilização do GAP através de aplicação de cimento resinoso (setas). E- esquema oclusal dos ratos controle (acima) e tratados (abaixo). Nos grupos tratados, 2 primeiros e 2 terceiros molares foram movidos de suas posições originais e perderam a intercuspidação com seus antagonistas, resultando em uma má oclusão experimental induzida ortodonticamente. *R*, direito; *L,* esquerdo; *M1*, primeiro molar; *M2*, segundo molar; *M3*, terceiro molar.

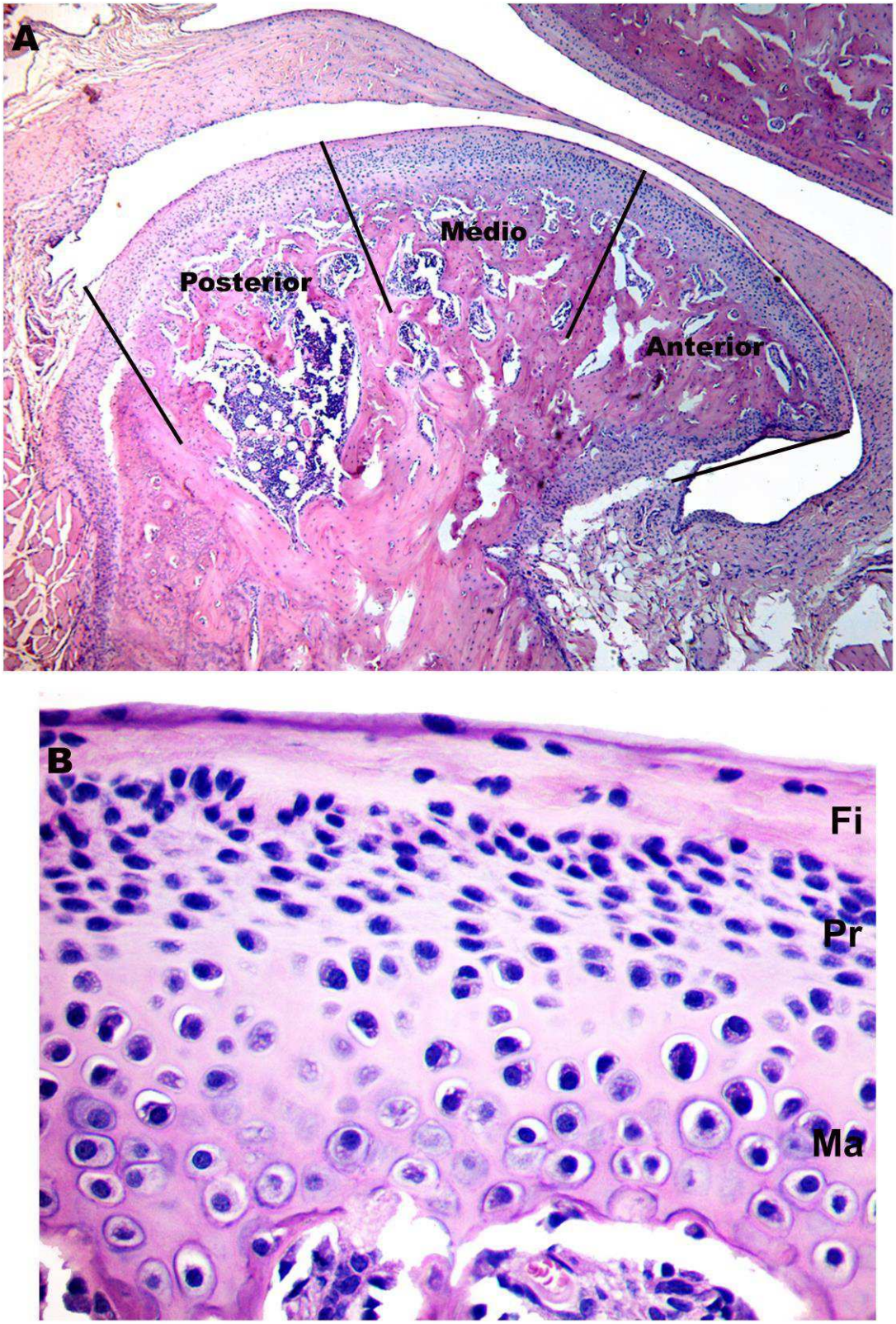

Fig 2. Metodologia de análise da CAM. A, secção sagital da ATM em animal controle de 12 semanas de vida. Para avaliação das alterações estruturais e contagem das células imunopositivas, a face articular da CAM foi dividida em terços anterior, médio e posterior. B, secção sagital central da ATM em animal controle de 12 de vida, mostrando as três camadas da cartilagem, sendo: Fi- fibrosa; Pr- proliferativa e Ma- madura. A: 40X; B: 400X. HE

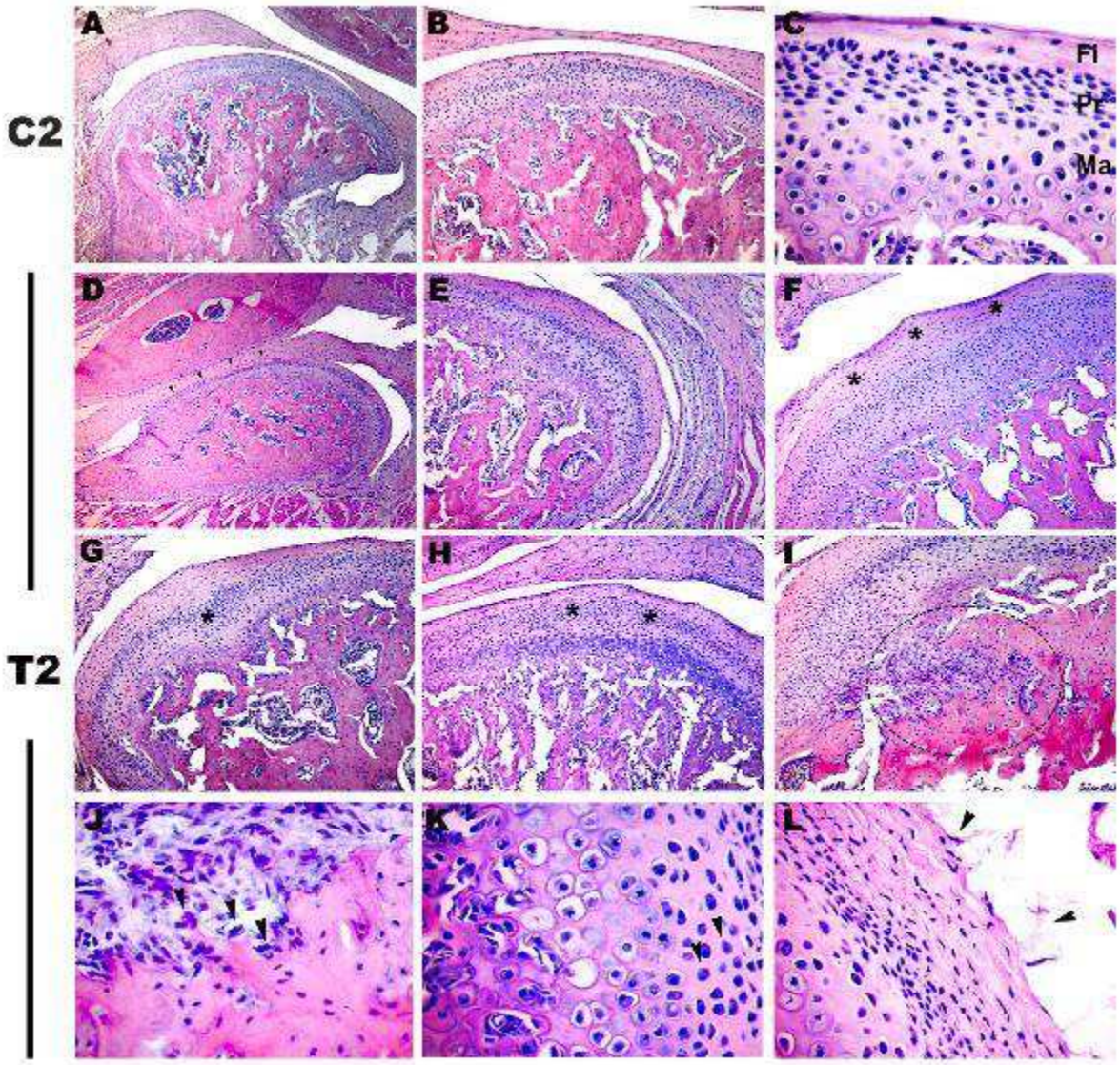

Fig. 3: Aspectos teciduais e celulares da CAM de animais controle e tratados por 2 semanas. A-C características morfológicas normais da CAM nos animais do grupo controle: Fi- camada fibrosa; Pr- camada proliferativa; Ma- camada madura. D-L Alterações morfológicas da CAM nos animais tratados. D- Aparente redução do espaço infra-discal com provável adesão entre o disco articular e a CAM (cabeças de setas). E- Aparente espessamento do terço posterior. F- Aparente espessamento da camada fibrosa (*). G e H- Espessamento dos terços posterior e médio da CAM, respectivamente. I- Desarranjo da CAM na interface com o osso subjacente (elipse). J- Presença de osteoclastos (cabeças de setas) com sugestão de reabsorção óssea. K- Presença de condrócitos com núcleo condensado e redução do citoplasma (cabeças de setas). L- Fibrilação da face articular (cabeças de setas). A e D: 40X; B, E-I: 100X; C, J-L: 400X. HE.

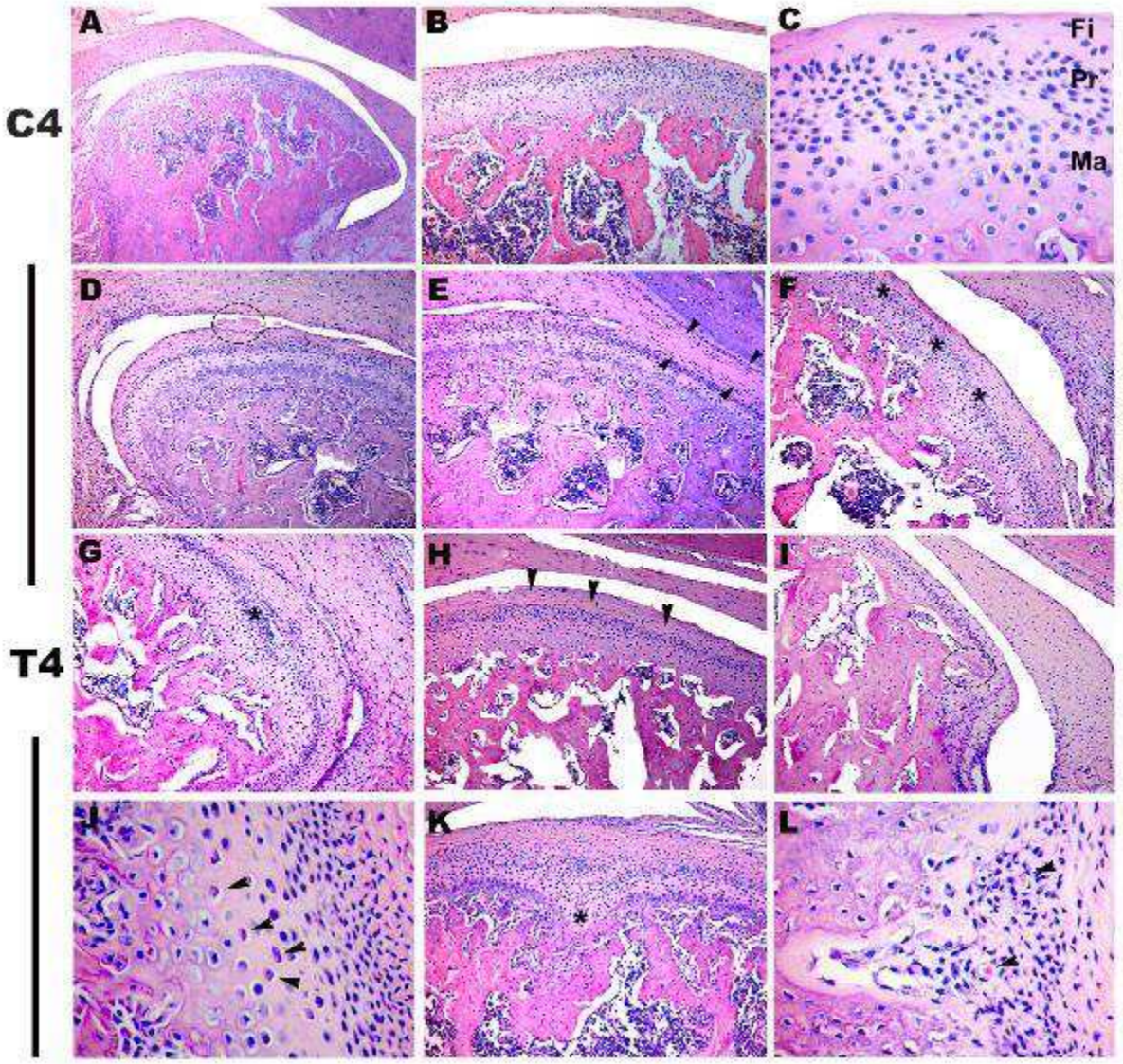

Fig. 4: Aspectos teciduais e celulares da CAM de animais controle e tratados por 4 semanas. A-C Características morfológicas normais da CAM nos animais do grupo controle: Fi- camada fibrosa; Pr- camada proliferativa; Ma- camada madura. D-L Alterações morfológicas da CAM nos animais tratados. D- Depósito de componente eosinofílico na cavidade articular (elipse). E- Adesão do disco articular à CAM (cabeças de setas). F- Aumento aparente da densidade de células da camada proliferativa (*). G- Desorganização da camada proliferativa, com aumento na densidade celular (*). H- Redução na densidade de células na camada fibrosa (*). I- Presença de osteófito (elipse). J- Condrócitos com núcleos eosinofílicos (cabeças de setas). K- Defeito ósseo com desarranjo das camadas profundas da CAM (*). L- Invasão vascular na CAM (cabeças de setas). A: 40X; B, D-I e K: 100X; C, J e L: 400X. HE.

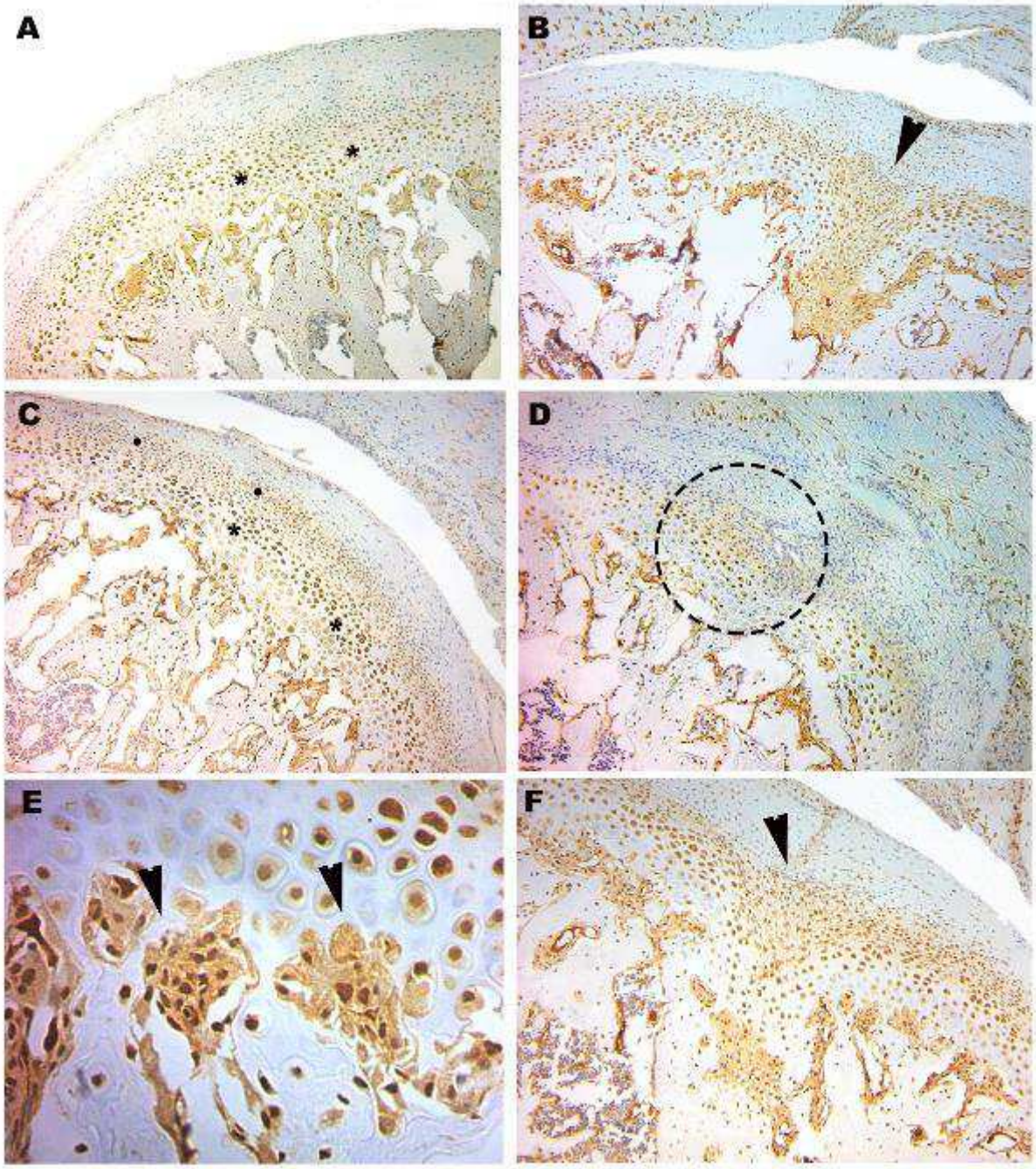

Fig. 5: Correspondência entre alterações teciduais e expressão de TIMP-1 na CAM dos animais tratados. A- Condrócitos imunomarcados nas áreas de espessamento da camada madura (*). B- Aumento da expressão de TIMP-1 nos condrócitos e na MEC em área de desarranjo da CAM, com aparente invasão da camada proliferativa nas camadas subjacentes (cabeça de seta). C- Imunomarcação em áreas de espessamento das camadas proliferativa (º) e madura (*). D- Expressão de TIMP-1 na MEC em área de desarranjo da camada proliferativa (elipse). E- Imunomarcação de áreas com atividade osteoclástica (cabeças de setas). F- Expressão de TIMP-1 em área de desorganização da camada proliferativa e condrócitos com alteração em sua morfologia (cabeça de seta). A, B, C, D, F: 100X; E: 400X. IHQ.

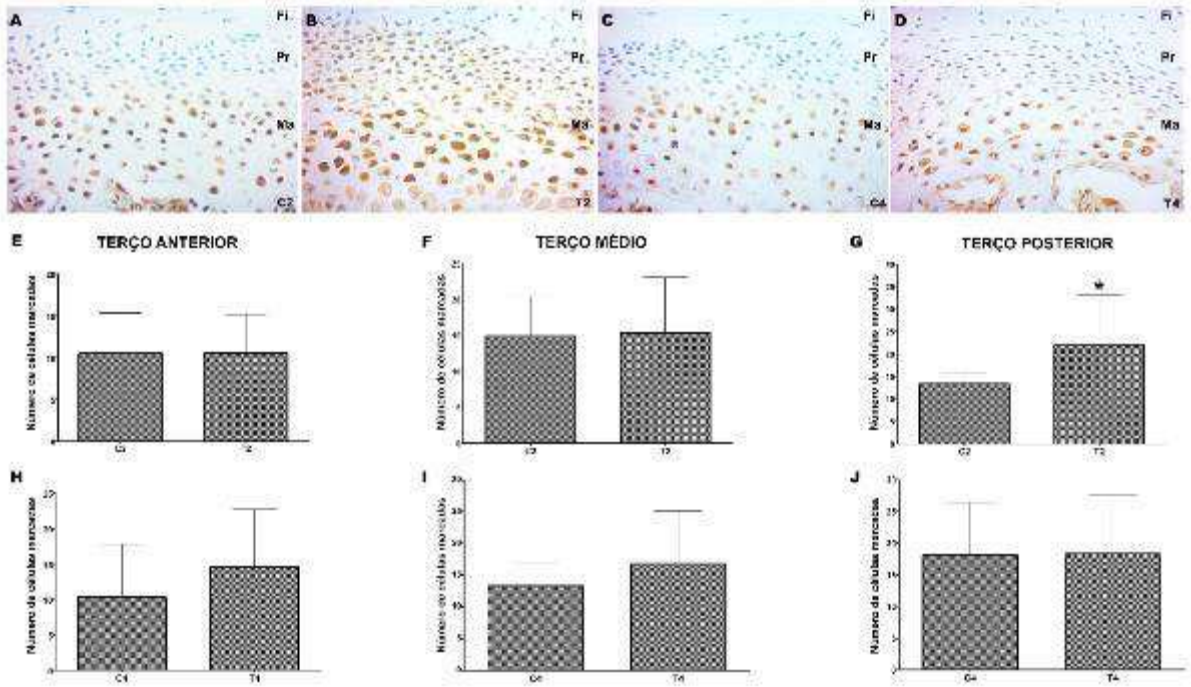

Fig. 6: Imuno-histoquímica de TIMP-1 na CAM nos diferentes tempos experimentais. A-C expressão de TIMP-1 em animais controle de 2 (A) e 4 semanas (C) demonstrou que a enzima foi observada de maneira restrita e uniforme em condrócitos da camada madura. B-D mudanças na expressão da enzima nos animais tratados de 2 (B) e 4 semanas (D) demonstrou que a expressão de TIMP-1 nos condrócitos se estendeu para outras camadas da CAM e na MEC, sendo possível identificar presença de células imunopositivas nas camadas proliferativa e madura da CAM. E-J Análise quantitativa da expressão de TIMP-1 nos terços da CAM. E, F e G representam os gráficos dos terços anterior, médio e posterior dos animais controle e tratados por 2 semanas, respectivamente. Pode-se observar que nos terços anterior e médio não há diferença entre os grupos (E e F), enquanto que no terço posterior dos animais do grupo tratado a expressão da enzima foi maior do que nos animais controle (G, p=0,0291). H, I e J representam os gráficos dos terços anterior, médio e posterior dos animais controle e tratados por 4 semanas, nos quais não houve diferença entre os grupos avaliados. A, B, C, D: 400X.

Tabelas

Tabela I: Distribuição dos aspectos morfológicos observados nos grupos tratados

ASPECTOS ESTRUTURAIS	ANIMAIS T2 (n=6)	ANIMAIS T4 (n=6)
1/3 posterior aumentado	83,33% (n=5)	83,33% (n=5)
1/3 medio aumentado	66,66% (n=4)	16,66% (n=1)
Invasão osso subjacente 1/3 posterior	50% (n=3)	50% (n=3)
Invasão osso subjacente 1/3 médio	33,33% (n=2)	16,66% (n=1)
Invasão osso subjacente 1/3 anterior	33,33% (n=2)	16,66% (n=1)
Áreas acelulares eosinofílicas	50% (n=3)	33,33% (n=2)
Camada madura aumentada	33,33% (n=2)	33,33% (n=2)
Camada proliferativa aumentada	33,33% (n=2)	66,66% (n=4)
Camada fibrosa aumentada	83,33% (n=5)	100% (n=6)
Redução do espaço infra-discal	16,66% (n=1)	50% (n=3)
Aderência do disco à camada fibrosa	33,33% (n=2)	50% (n=3)
Presença de fibrilações	16,66% (n=1)	0% (n=0)
Formação de osteófito	16,66% (n=1)	16,66% (n=1)
Atividade osteoclástica	66,66% (n=4)	66,66% (n=4)
Presença de vasos sanguíneos	33,33% (n=2)	50% (n=3)
Condrócitos com núcleos eosinofílicos	50% (n=3)	33,33% (n=2)
Condrócitos com citoplasma condensado	33,33% (n=2)	16,66% (n=1)

Tabela II: Distribuição das células marcadas para TIMP-1 nos terços da CAM nos diferentes tempos experimentais

TERÇO	ANTERIOR		MÉDIO		POSTERIOR		ANTERIOR		MÉDIO		POSTERIOR	
GRUPOS	T2	C2	T2	C2	T2	C2	T4	C4	T4	C4	T4	C4
MÉDIA	12	8	14	14	18,5	13,67	12,67	8,67	14,67	12,33	17	16
SD	2,83		0		3,42		2,83		1,65		0,71	
P	0,8953		0,9563		0,0291*		0,1372		0,3737		0,9616	

* Teste de Mann-Whitney. Dados significativos considerando p > 0.05

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados demonstram que uma desordem oclusal induzida ortodonticamente pode levar a alterações estruturais características da OA, além de mudanças na expressão e no padrão de distribuição da TIMP-1. Apesar de serem necessárias futuras investigações a respeito dos mecanismos celulares e moleculares que associam a má oclusão com a sobrecarga da ATM, este estudo foi importante para o entendimento do desenvolvimento dessa desordem temporomandibular.

REFERÊNCIAS GERAIS

1. Sartoretto, S. C., Bello, Y. D., Bona, A. D., & Azevedo, M. S. Evidências científicas para o diagnóstico e tratamento da DTM e a relação com a oclusão e a ortodontia. *RFO UPF* 2012 ; *17*(3), 352-359.

2. Galhardo, M. S., Caldini, E. G., Battlehner, C. N., & Toledo, O. M. S. Age-dependent physiological changes in the histoarchitecture of the articular cartilage of the rabbit mandibular condyle: a morphological and morphometric study. *Cells Tissues Organs* 2012; *195*(4), 340-352.

3. Luder, H. U. Frequency and distribution of articular tissue features in adult human mandibular condyles: a semiquantitative light microscopic study. *The Anatomical Record 1997*; *248*(1), 18-28.

4. Bae, J. W., Takahashi, I., Sasano, Y., Onodera, K., Mitani, H., Kagayama, M., & Mitani, H. Age-related changes in gene expression patterns of matrix metalloproteinases and their collagenous substrates in mandibular condylar cartilage in rats. *Journal of anatomy* 2003; *203*(2), 235-241.

5. Mow, V. C., Ratcliffe, A., & Poole, A. R. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* 1992; *13*(2), 67-97.

6. Okeson, J. P. Diagnóstico diferencial e considerações sobre o tratamento das desordens temporomandibulares. *Okeson JP. Dor orofacial: guia de avaliação, diagnóstico e tratamento. The American Academy of Orofacial Pain. Chicago: Quintessence* 1998; 113-84.

7. Manfredini, D., Guarda-Nardini, L., Winocur, E., Piccotti, F., Ahlberg, J., & Lobbezoo, F. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: a systematic review of axis I epidemiologic findings. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics 2011*, *112*(4), 453-462.

8. Liu, F., & Steinkeler, A. Epidemiology, diagnosis, and treatment of temporomandibular disorders. *Dental Clinics* 2013; *57*(3), 465-479.

9. Kalladka, M., Quek, S., Heir, G., Eliav, E., Mupparapu, M., & Viswanath, A. Temporomandibular joint osteoarthritis: diagnosis and long-term conservative management: a topic review. *The Journal of Indian Prosthodontic Society* 2014; *14*(1), 6-15.

10. Milam, S. B. Pathogenesis of degenerative temporomandibular joint arthritides. *Odontology* 2005; *93*(1), 7-15.

11. Goldring, M. B., & Marcu, K. B. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy* 2009; *11*(3), 224.

12. Wang, G. W., Wang, M. Q., Wang, X. J., Yu, S. B., Liu, X. D., & Jiao, K. Changes in the expression of MMP-3, MMP-9, TIMP-1 and aggrecan in the condylar cartilage of rats induced by experimentally created disordered occlusion. *Archives of oral biology* 2010; *55*(11), 887-895.

13. Stetler-Stevenson, W. G. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Science signaling* 2008; *1*(27), re6-re6.

14. Brew, K., & Nagase, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research 2010*; *1803*(1), 55-71.

15. Ries, C. Cytokine functions of TIMP-1. *Cellular and molecular life sciences* 2014; *71*(4), 659-672.

16. Wang, Y. L., Zhang, J., Zhang, M., Lu, L., Wang, X., Guo, M., ... & Wang, M. Q. Cartilage degradation in temporomandibular joint induced by unilateral anterior crossbite prosthesis. *Oral diseases* 2014; *20*(3), 301-306.

17. Wang, X. D., Zhang, J. N., Gan, Y. H., & Zhou, Y. H. Current understanding of pathogenesis and treatment of TMJ osteoarthritis. *Journal of dental research* 2015; *94*(5), 666-673.

ANEXOS

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado" Análise de aspectos morfológicos e moleculares da articulação temporomandibular em má oclusão experimental"**Protocolo n°.50/2016,sob a responsabilidade de** Letícia Nogueira da Gama de Souza **pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica(ou ensino)encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n°6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal(CONCEA),e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruípe-Vitória-ES em 04-11-2016.**

Vigência do Projeto	Início:Novembro/2016 Término:Janeiro/2020
Espécie/Linhagem	**Ratos Wistar**
Nº de Animais	Experimento Piloto:2 Protocolo Experimental:24 Total:26
Peso/Idade	Peso: 200g Idade:8 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	Mamíferos

Vitória (ES), 04 de novembro de 2016.

Prof. Roger Lyrio dos Santos
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/CCS/UFES

ANEXO B – DATASHEET TIMP-1

biorbyt
Explore. Bioreagents.

Antibodies Small Molecules Elisa Kits Biology Tools Proteins Services

TIMP1 antibody
orb11483

Tested applications	WB, IHC-P, IF/ICC, P-ELISA
Dilution range	IF/ICC: 1:100, IHC-P: 1:200, WB: 1:200-1000
Concentration	- 100 μg (in 200 μl): 0.5 mg/ml - 200 μg (in 400 μl): 0.5 mg/ml
Reacts with	Human, Rat, Pig
Host	Rabbit
Clonality	Polyclonal
Isotype	IgG
MW	23 kDa
Purity	Polyclonal antibodies are purified by peptide affinity chromatography
Form	10 mM PBS, 0.02% sodium azide
Conjugation	Unconjugated
UniProt ID	P01033 (Human); P12032 (Mouse)
NCBI	NP_003245.1; NM_003254.2
Entrez	7076
Pubmed	25929748
Storage	Store at 4°C for up to two weeks. For long term storage, aliquot and store at -20°C, avoid freeze/thaw cycles.
Note	For research use only.

Biorbyt Ltd.
5 Orwell Parking, Cowley Road,Cambridge, Cambridgeshire
CB4 0WY, United Kingdom
Email: info@biorbyt.com | Phone: +44 (0)1223 859 350 | Fax: +44(0)1223 280 240

Biorbyt LLC
369 Pine Street, Suite #503, San Francisco,
California, 94104, United States
Email: info@biorbyt.com | Phone: +1 (415)-608-5211 | Fax: +1 (415) 651 8668

ANEXO C – NORMAS DA *AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS*

AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS

Official Journal of the American Association of Orthodontists,
its constituent societies, the American Board of Orthodontics, and the College of Diplomates of the American Board of Orthodontics

TABLE OF CONTENTS

- **Description p.1**
- **Impact Factor p.1**
- **Abstracting and Indexing p.1**
- **Editorial Board p.2**
- **Guide for Authors p.3**

DESCRIPTION

AUTHOR INFORMATION PACK

ISSN: 0889-5406

Published for more than 100 years, the *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* remains the leading **orthodontic** resource. It is the official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, the American Board of Orthodontics, and the College of Diplomates of the American Board of Orthodontics. Each month its readers have access to original peer-reviewed articles that examine all phases of **orthodontic treatment**. Illustrated throughout, the publication includes tables, color photographs, and statistical data. Coverage includes successful diagnostic procedures, imaging techniques, bracket and archwire materials, extraction and impaction concerns, orthognathic surgery, TMJ disorders, removable appliances, and adult therapy.

According to the 2017 Journal Citation Reports®, published by Thomson Reuters, *AJO-DO* is the highest ranked orthodontic title by number of citations. *AJO-DO* ranks 30th of 91 journals for total citations in the Dentistry, Oral Surgery and Medicine category, and has a five year impact factor of 2.201.

Benefits to authors

The *AJO-DO* provides many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications, and much more. Please click here for more information on our author services.

Please see our Guide for Authors for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our Support Center

IMPACT FACTOR

2016: 1.472 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2017

ABSTRACTING AND INDEXING

Scopus MEDLINE® CINAHL

AUTHOR INFORMATION PACK 17 Feb 2018

www.elsevier.com/locate/ajodo 1

EDITORIAL BOARD

Editor- in-Chief

Rolf G. Behrents, DDS, MS, PhD, St. Louis, MO ***Editor Emeritus***

David L. Turpin, DDS, MSD, Seattle, WA **Wayne G. Watson, DDS**, La Jolla, CA

Managing Editor

Chris Burke, Seattle, WA

Associate Editors

Biology

David Covell, Jr, DDS, MSD, PhD, Portland, OR ***Dental Materials***

Theodore Eliades, DDS MS, Dr Med Sci, PhD, FIMMM, FRSC, FInstP, Zurich, Switzerland ***Evidence-Based Dentistry***

Padhraig S. Fleming, MSc, PhD, MOrth, RCS, FDS (Orth), FHEA, London, United Kingdom ***Resident's Journal Review***

Dan Grauer, DDS, MSD, PhD, Los Angeles, CA ***Ethics in Orthodontics***

Peter M. Greco, DMD, Philadelphia, PA ***Case Reports***

John Grubb, DDS, MSD, Escondido, CA ***Imaging***

Demetrios J. Halazonetis, DDS, MS, Kifissia, Greece ***Litigation and Legislation***

Laurance Jerrold, DDS, JD, Brooklyn, NY ***Craniofacial Anomalies / Cleft Lip and Palate***

Christos Katsaros, DDS, Dr med dent, Odont Dr/PhD, Bern, Switzerland ***Clinician's Corner***

Steven D. Marshall, MS, DDS, MS, Iowa City, IA ***Continuing Education***

Allen H. Moffitt, DMD, Murray, KY ***Techno Bytes***

J. Martin Palomo, DDS, MSD, Cleveland, OH ***Statistics and Research Design***

Nikolaos Pandis, DDS, MS, Dr med dent, MSc, PhD, Bern, Switzerland ***TMD Function***

John W. Stockstill, DDS, MS, Atlanta, GA ***Biology***

Zongyang Sun, DDS, MS, MSD, PhD, Columbus, OH ***Growth and Developmen***

Leslie A. Will, DMD, MSD, Boston, MA ***American Board of Orthodontics***

Chun-Hsi Chung, DMD, MS, Philadelphia, PA ***Staff:***

Jane Ryley, Publisher, Elsevier Inc.
Amy Norwitz, Journal Manager, Elsevier Inc.

AUTHOR INFORMATION PACK 17 Feb 2018

www.elsevier.com/locate/ajodo 2

GUIDE FOR AUTHORS

General Information

The *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* publishes original research, reviews, case reports, clinical material, and other material related to orthodontics and dentofacial orthopedics.

Submitted manuscripts must be original, written in English, and not published or under consideration elsewhere. Manuscripts will be reviewed by the editor and consultants and are subject to editorial revision. Authors should follow the guidelines below.

Statements and opinions expressed in the articles and communications herein are those of the author(s) and not necessarily those of the editor(s) or publisher, and the editor(s) and publisher disclaim any responsibility or liability for such material. Neither the editor(s) nor the publisher guarantees, warrants, or endorses any product or service advertised in this publication; neither do they guarantee any claim made by the manufacturer of any product or service. Each reader must determine whether to act on the information in this publication, and neither the Journal nor its sponsoring organizations shall be liable for any injury due to the publication of erroneous information.

Electronic manuscript submission and review

The American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics uses the *Elsevier Editorial System (EES)*, an online manuscript submission and review system.

To submit or review an article, please go to the AJO-DO EES website: http://ees.elsevier.com/ajodo. Rolf G. Behrents, Editor-in-Chief

E-mail: behrents@gmail.com

Send other correspondence to:
Chris Burke, Managing Editor
American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics University of Washington
Department of Orthodontics, D-569
HSC Box 357446

Seattle, WA 98195-7446
Telephone (206) 221-5413
E-mail:ckburke@aol.com

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Conflict of interest

Each author should complete and submit a copy of the International Committee of Medical Journal Editors Form for the Disclosure of Conflicts of Interest, available at http://www.icmje.org/conflicts-of-interest/.

AUTHOR INFORMATION PACK 17 Feb 2018 www.elsevier.com/locate/ajodo 3

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

Open access

The American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics offers authors a choice in publishing their research:

Traditional Access

Articles are available at no additional cost to subscribers through individual or library subscriptions. Users in some developing countries and patient groups can access articles through our universal access programs. Other users can access articles on a pay-per-view basis. No publication fees are charged for traditional publication.

Open access

Open access articles are available to subscribers and nonsubscribers, and to the wider public with permitted reuse. For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses. The open access publication fee for this journal is $3000, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: http://www.elsevier.com/openaccesspricing. *Green open access*

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

Green open access embargo period

For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

AUTHOR INFORMATION PACK 17 Feb 2018 www.elsevier.com/locate/ajodo 5

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Blinding

The *AJO-DO* uses a blind review process; the identity of the author and the location of the research are concealed from the reviewers, and the identities of the reviewers are concealed from the author. The following submission items are sent to reviewers during the review process and should not contain any identifying information.

Manuscript * Figures * Tables * Other Material
The title page, which should contain complete author information, is not sent to reviewers. In the manuscript, please pay special attention to Material and Methods and Acknowledgments sections; wherever author is mentioned, use the "hidden" format in Word to conceal it, or move it to the title page.

Guidelines for Original Articles

guidelines Submit Original Articles via EES: http://ees.elsevier.com/ajodo.
Before you begin, please review the guidelines below. To view a 7-minute 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 e-mail 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;126:36-47); 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 "read-only." 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.

AUTHOR INFORMATION PACK 17 Feb 2018 www.elsevier.com/locate/ajodo 6

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.

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.

Guidelines for Systematic Reviews

Systematic Reviews and Meta-Analyses must be prepared according to contemporary PRISMA (Preferred Reporting for Systematic Reviews and Meta-Analyses) standards. The *AJO-DO* will screen submissions for compliance before beginning the review process. To help authors understand and apply the standards, we have prepared a separate Guidelines for AJO-DO Systematic Reviews and Meta-Analyses. This guide includes links to a Model Orthodontic Systematic Review and an accompanying Explanation and Elaboration document.

These guidelines are supplemental to the Guidelines for Original Articles, which describe how to meet general submission requirements, such as figure formats, reference style, required releases, and blinding.

Systematic Review and Meta-Analysis Guide for Authors

You can access a link to an annotated example of a Model Orthodontic Systematic Review. Further explanation of reporting practices is given in the accompanying Explanation and Elaboration document. These documents have been prepared in accordance with PRISMA guidelines and the "PRISMA Statement for Reporting Systematic Reviews and Meta-Analyses of Studies that Evaluate Health Care Interventions: Explanations and Elaboration" (http://www.plosmedicine.org/article/info:doi/10.1371/journal.pmed.1000100).

However, we have made these guidelines more relevant to orthodontics and have adapted the reporting template to encourage transparent and pertinent reporting by introducing subheadings corresponding to established PRISMA items.

Further information on reporting of systematic reviews can also be obtained in the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions (http://www.cochrane-handbook.org).

Guidelines for Randomized Clinical Trials

Randomized Clinical Trials must meet current CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials) requirements. The *AJO-DO* will screen submissions for compliance before beginning the review process. To help authors understand and apply the standards, we have prepared a separate document, Guidelines for AJO-DO Submissions: Randomized Clinical Trials. This document contains links to an Annotated RCT Sample Article and The CONSORT Statement: Application within and adaptations for orthodontic trials.

These guidelines are supplemental to the Guidelines for Original Articles, which describe how to meet general submission requirements, such as figure formats, reference style, required releases, and blinding.

Guidelines for Miscellaneous Submissions

Letters to the Editor and their responses appear in the Readers' Forum section and are encouraged to stimulate healthy discourse between authors and our readers. Letters to the Editor must refer to an article that was published within the previous six (6) months and must be less than 500 words including references. Submit Letters via the EES Web site. Submit a signed copyright release with the letter.

Brief, substantiated commentary on subjects of interest to the orthodontic profession is published occasionally as a Special Article. Submit Guest Editorials and Special Articles via the Web site.

Books and monographs (domestic and foreign) will be reviewed, depending upon their interest and value to subscribers. Send books to Chris Burke, Department of Orthodontics, University of Washington D-569, HSC Box 357446, Seattle,WA98195-7446. They will not be returned.

Checklist for Authors

_____Title page, including full name, academic degrees, and institutional affiliation and position of each author; brief description of each author's contribution to the submission; and author to whom correspondence and reprint requests are to be sent, including address, business and home phone numbers, fax numbers, and e-mail address

_____Highlights (up to 5 Highlights, written in complete sentences, 85 characters each
_____Abstract (structured, 250 words; a graphical abstract is optional) _____Manuscript, including references and figure legends
_____Figures, in TIF or EPS format

_____Tables
_____Copyright release statement, signed by all authors
_____Photographic consent statement(s)
_____ICMJE Conflict of interest statement for each author
_____Permissions to reproduce previously published material
_____Permission to reproduce proprietary images (including screenshots that include a company logo)

PREPARATION

Double-blind review

This journal uses double-blind review, which means the identities of the authors are concealed from the reviewers, and vice versa. More information is available on our website. To facilitate this, please include the following separately:
Title page (with author details): This should include the title, authors' names, affiliations, acknowledgements and any Declaration of Interest statement, and a complete address for the corresponding author including an e-mail address.

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

Article structure

AUTHOR INFORMATION PACK 17 Feb 2018 www.elsevier.com/locate/ajodo 8

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. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent

address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

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

Graphical abstract

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

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

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). You can view example Highlights on our information site.

AUTHOR INFORMATION PACK 17 Feb 2018 www.elsevier.com/locate/ajodo 9

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).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Artwork

Image manipulation

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

Electronic artwork
General points
• Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
• Embed the used fonts if the application provides that option.
• Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
• Number the illustrations according to their sequence in the text.
• Use a logical naming convention for your artwork files.
• Provide captions to illustrations separately.
• Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
• Submit each illustration as a separate file.
A detailed guide on electronic artwork is available.
You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. *Formats*
If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.
Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.
TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.
TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.
Please do not:
• Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
• Supply files that are too low in resolution;
• Submit graphics that are disproportionately large for the content.

AUTHOR INFORMATION PACK 17 Feb 2018 www.elsevier.com/locate/ajodo 10

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. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

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

Tables

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

References

Citation in text

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

Reference links

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

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. Journal of Geophysical Research, https://doi.org/10.1029/2001JB000884. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

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.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

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.

AUTHOR INFORMATION PACK 17 Feb 2018 www.elsevier.com/locate/ajodo 11

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, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins 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/use-citation-style/american-journal-of-orthodontics-and-dentofacial-orthopedics When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-

ins 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;16351-9.
Reference to a book:
2. Strunk Jr W, White EB. The elements of style. 4th ed. New York: Longman; 2000.
Reference to a chapter in an edited book:
3. Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age. New York: E-Publishing Inc; 2009. p. 281-304.
Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors

the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;**277**:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Video

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 file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. 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.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

AUTHOR INFORMATION PACK 17 Feb 2018 www.elsevier.com/locate/ajodo 12

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more

information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

Submission Checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.
Ensure that the following items are present:
One author has been designated as the corresponding author with contact details:

• E-mail address
• Full postal address
• Phone numbers
All necessary files have been uploaded, and contain:
• All figure captions

• All tables (including title, description, footnotes)
Further considerations
• Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
• References are in the correct format for this journal
• All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

AUTHOR INFORMATION PACK 17 Feb 2018 www.elsevier.com/locate/ajodo 13

• 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. For more information about permission issues, contact permissionshelpdesk@elsevier.com or visit http://www.elsevier.com/about/policies/author-agreement/obtaining-permission.

Permission is also required for the following images:

•Photos of a product if the product is identified or can reasonably be identified from the photo •Logos
•Screenshots that involve copyrighted third-party material, whether a reasonably identifiable user interface or any nonincidental material appearing in the screenshot

AFTER ACCEPTANCE

Proofs

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

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

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.
You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

© Copyright 2018 Elsevier | https://www.elsevier.com