



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Mariana Caires Sobral de Aguiar

**Determinação da fase de crescimento através de análise radiográfica e da
fosfatase alcalina óssea na saliva**

Rio de Janeiro

2020

Mariana Caires Sobral de Aguiar

Determinação da fase de crescimento através da análise radiográfica e da fosfatase alcalina óssea na saliva



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, área de concentração: Ortodontia.

Orientador: Prof. Dr. Jonas Capelli Júnior

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB/B

A282 Aguiar, Mariana Caires Sobral de.
Determinação da fase de crescimento através de análises radiográficas e da fosfatase alcalina óssea na saliva / Mariana Caires Sobral de Aguiar. – 2020.
66 f.

Orientador: Jonas Capelli Junior

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.

1. Desenvolvimento ósseo. 2. Desenvolvimento maxilofacial. 3. Radiografia dentária. 4. Fosfatase alcalina - análise. 5. Saliva. 6. Criança. 7. Adolescente. I. Capelli Junior, Jonas. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. III. Título.

CDU
616.314

Bibliotecária: Adriana Caamaño CRB7/5235

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Mariana Caires Sobral de Aguiar

**Determinação da fase de crescimento através da análise radiográfica e da fosfatase
alcalina óssea na saliva**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, área de concentração: Ortodontia.

Aprovada em 17 de fevereiro de 2020.

Orientador:

Prof. Dr. Jonas Capelli Júnior
Faculdade de Odontologia - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fabio Ramoa Pires
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.^a Dra. Cristiane Canavarro Rodrigues Martins
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof. Dr. Alexandre Trindade Simões da Motta
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, por estar sempre ao meu lado. Dedico também aos participantes desta pesquisa e seus responsáveis, fundamentais para a realização do trabalho.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo às pessoas que tornaram este trabalho possível: os pacientes e seus responsáveis. Sem estes, nada disso teria acontecido. O atendimento a tantas crianças e adolescentes, conhecer um pouco de suas histórias e famílias tornaram o processo da pesquisa muito mais prazeroso e enriquecedor, principalmente como ser humano.

Agradeço imensamente à minha família, por todo o apoio, desde a decisão de fazer o mestrado até nos momentos que eu achava que tudo poderia dar errado. Agradeço também por me permitirem viver esse sonho de maneira tranquila, sem cobranças e com muita compreensão quando tive que me ausentar para estudar ou estar na faculdade. Não consigo ser mais grata por ser filha da Ana Maria e do Thomaz, e irmã da Juliana, meus maiores exemplos e inspirações diárias.

Ao professor Jonas, apenas um “obrigada pela ajuda” seria pouco. Obrigada por acreditar no potencial de seus alunos, mesmo que eles mesmos duvidem de si. Obrigada por ser uma inspiração de dedicação à Ortodontia e à carreira acadêmica. Obrigada por saber puxar a orelha na hora certa e nos colocar para cima quando precisamos. Obrigada por ser o capitão do Time Capelli, que tanto se ajuda e é tão querido por todos. Obrigada!

Agradeço também a todos os professores que fizeram parte desse caminho. Vocês foram uma parte importante de a UERJ ter sido minha escolha na especialização e no mestrado. Ao professor José Augusto, meu muito obrigada por ter nos introduzido a vida da docência, permitindo ter tanto contato com a graduação. Obrigada por nos ter ajudado a compreender melhor a relação professor/aluno. À professora Flávia Artese, um obrigada especial por me deixar ajudar um pouco na sua clínica e aprender tanto com seu conhecimento. Obrigada por ser uma palestrante que tanto me inspira, nas apresentações, no modo de falar e no domínio da plateia.

Obrigada a doutoranda Lívia Nunes, grande parceira de time e amiga nessa jornada. Agradeço por ter sido uma pessoa tão querida comigo nesse período, como é desde a especialização. Esta jornada de parceria, que começou lá em 2014 e só se fortaleceu com o tempo. Obrigada por ser um exemplo de aluna e pessoa para todos que convivem com você. Você é inspiração e tenho certeza do futuro brilhante que te aguarda!

Aos alunos de doutorado Caroline Pelágio, Davi Alencar, Isabela Holz, Manuel Gustavo e Sergio Caetano, agradeço a amizade e ajuda em tantos momentos. Obrigada por serem inspirações e tantas vezes nosso suporte no mestrado. Um agradecimento especial à

Luciana Quintanilha, menina de ouro do time Capelli, com suas admiráveis dedicação e capacidade. Mais uma baita inspiração, que começou lá na graduação.

Agradeço imensamente às amigas de mestrado, Ana Beatriz Pereira, Larissa Moda e Tatiana Ettore. Obrigada por serem porto seguro nas horas mais difíceis, por serem tão parceiras e encontrarem graça onde às vezes só havia desespero. Obrigada pela chance de conviver com mulheres tão admiráveis, que deixaram muita coisa de lado para viver esse mestrado. Um muito obrigada especial à amiga Bia, que esteve sempre comigo, ajudando, apoiando, sofrendo junto... enfim, como uma verdadeira amiga, herdada dos tempos de especialização. Que você continue iluminando o caminho e a vida das pessoas ao seu redor, com todo seu talento e capacidade!

Agradeço aos alunos da especialização, que estiveram presentes nestes dois anos e tanto me ajudaram na coleta dos pacientes, especialmente à turma 38, que viveu os dois anos de especialização junto aos meus dois de mestrado. Obrigada pela parceria e por me deixarem ajudar no que estava ao meu alcance, permitindo que eu aprendesse ainda mais. Agradeço especialmente às minhas queridas Amanda Marques, Ana Luiza Lopes e Maria Fernanda Mattos, que estiveram sempre juntas a mim, ajudando no que podiam e sendo verdadeiras parceiras nessa jornada, tornando-se amigas muito especiais.

Agradeço também aos alunos de graduação, que nos permitiram aprender e colocar em prática essa profissão incrível que é ser professora. Ter contato com vocês fez muita diferença na formação de mestre.

Agradeço às queridas Fernanda Galvão e Isabel Santos, que tanto nos ajudam. Obrigada por nos colocarem para cima e por sempre estarem disponíveis a me ajudar nesses quatro anos.

Agradeço também à Capes e à FAPERJ pela bolsa permanência e pelo financiamento recebido pelo nosso projeto, que permitiu a realização deste estudo.

A educação   a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.

Nelson Mandela

RESUMO

AGUIAR, Mariana Caires Sobral de. **Determinação da fase de crescimento através de análises radiográficas e da fosfatase alcalina óssea na saliva**. 2020. 66f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Ao tratar pacientes em crescimento, especialmente os portadores de más-oclusões esqueléticas de classes II e III, onde espera-se redirecioná-lo, é fundamental a determinação do estágio de crescimento do indivíduo. Para tal, existem diversas técnicas, como as radiográficas e as enzimáticas. O objetivo deste estudo determinar a fase de crescimento através dos níveis e da correlação dos valores de um biomarcador ósseo (fosfatase alcalina óssea) e duas técnicas radiográfica. Foram selecionados 65 pacientes de ambos os sexos, com idade média de 12,7 anos, em busca de tratamento ortodôntico nos setores de Ortodontia e Odontopediatria da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e que se enquadraram nos critérios de inclusão/exclusão. Os indicadores de crescimento ósseo radiográficos escolhidos foram os estágios de maturação das vértebras cervicais, avaliados através da radiografia cefalométrica lateral, e os da maturação da falange média do terceiro dedo, obtida em exame da área de interesse, na mão direita. Após a obtenção e o devido processamento das radiografias, estas foram avaliadas por dois avaliadores previamente calibrados, utilizando os métodos de Bacetti e Perinetti para as radiografias cefalométrica e do terceiro dedo, respectivamente. O índice de concordância kappa demonstrou boa reprodutibilidade intra e inter-examinadores. Na avaliação intra-examinador, o resultado de kappa foi de 0,711 para a maturação vertebral e 0,893 para a maturação da falange. Quanto a correlação inter-examinador, a avaliação da maturação da falange média, o valor de kappa ponderado foi de 0,923 enquanto para o da maturação das vértebras cervicais foi de 0,864. O terceiro indicador de crescimento avaliado neste trabalho foi a quantificação da fosfatase alcalina óssea na saliva. A coleta da saliva foi realizada entre 9 e 11 horas da manhã, sem estímulo químico ou mecânico. O processamento da saliva foi feito através de um ensaio de imunoabsorção enzimática, com posterior determinação da densidade óptica através de um espectrofotômetro. Os valores obtidos neste ensaio foram então correlacionados aos estágios de crescimento pré-pico, pico e pós-pico de crescimento puberal, determinados por ambas as radiografias. Após a aplicação do teste ANOVA, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os estágios de crescimento puberal. Como não houve variação dos níveis da fosfatase alcalina entre os diferentes estágios maturacionais, pode-se inferir que a avaliação desta enzima na saliva pode não ser um indicador confiável do crescimento ósseo. A quantificação desta enzima pode ser avaliada em outros fluidos corpóreos, como sangue ou fluido gengival.

Palavras-chave: Crescimento. Metabolismo ósseo. Radiografia. Fosfatase alcalina. Saliva.

ABSTRACT

AGUIAR, Mariana Caires Sobral de. **Growth phase determination through radiographic analysis and bone alkaline phosphatase in saliva**. 2020. 66f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

When treating growing patients, especially those who have a skeletal class II or III condition, where the willing is to redirect growth, it is indispensable to determine the individual's growing stage. For this determination, there are different methods, radiographic or enzymatic. The aim of this study was to assess the levels of a bone biomarker (bone-alkaline phosphatase) and its correlation to two different radiographic techniques. Sixty-five patients of both sex and mean age of 12.7 years old looking for treatment at Orthodontics and Pediatric Dentistry sectors in the State University of Rio de Janeiro were selected for filling the inclusion/exclusion criteria. The radiographic growing indicators chosen for this study were the maturational stages of cervical vertebrae (CVM), assessed in lateral cephalometric radiograph, and maturational stages of the middle phalanx of the third finger (MP3), acquired in a radiograph taken from the interested area on the right hand. After obtaining and processing the X-rays, those were assessed by two calibrated examiners. They have used the methods proposed by Baccetti and Perinetti to assess lateral and third finger X-rays, respectively. The Cohen's kappa index of agreement showed a good reproducibility intra and inter-examiner. The intra-observer rater, the result was a kappa of 0,711 to cervical vertebrae maturation and 0,893 to third finger middle phalanx maturation. Inter-observer weighted and unweighted kappa values were 0.864 and 0.693 for and 0.923 and 0.868, respectively, for MP3 method. The third maturational growth indicator analyzed in this study was the quantification of salivary bone-alkaline phosphatase, a biomarker of bone metabolism. The patients were asked to expel unstimulated whole saliva between nine and eleven in the morning. Those samples were collected and stored according to the orientations of the analysis kit. Saliva were processed through an immunosorbent assay, with posterior determination of optical density by spectrophotometry. The resulting values of this assay were then correlated to the three stages of pubertal growth: pre-, pubertal and post-pubertal. An ANOVA test was used to correlate that information and as a result, it was not found a statistically significant correlation between bone alkaline phosphatase levels and maturational stages. As no difference was found, quantification of this enzyme in saliva may not be a reliable maturational growth indicator. The assessment of bone alkaline phosphatase should be done in other body fluids, as blood serum or gingival fluid.

Keywords: Growth. Bone metabolism. Radiograph. Alkaline phosphatase. Saliva.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação esquemática dos diferentes estágios de maturação óssea da falange média do terceiro dedo	36
Figura 2 –	Representação esquemática dos diferentes estágios de maturação óssea da maturação das vértebras cervicais	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Distribuição demográfica para cada grupo de crescimento puberal de acordo com os indicadores de crescimento	39
Tabela 2 –	Níveis de FAO (em densidade óptica – AU*E3) e concentração para cada um dos grupos	39
Tabela 3 -	Densidade óptica (obtida a partir da leitura no espectrofotômetro) de acordo com os indicadores do crescimento (MFM e MVC)	40
Tabela 4 -	Concentração da FAO salivar de acordo com os indicadores do crescimento (MFM e MVC)	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALARA	<i>As Low as Reasonable Achievable</i>
ANB	Diferença entre os ângulos SNA e SNB
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)
BALP	<i>Bone Alkaline Phosphatase</i> (Fosfatase Alcalina Óssea)
col	Colaboradores
C1-C7	Vértebras Cervicais 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7
CVMS	<i>Cervical Vertebrae Maturation Stage</i>
CS	<i>Cervical Stage</i>
dpi	<i>Dots per inch</i>
FAL	Fosfatase Alcalina
FAO	Fosfatase Alcalina Óssea
FGC	Fluido Gengival Crevicular
GP	Giuseppe Perinetti (avaliador)
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i> (Fator de crescimento semelhante à insulina tipo-1)
mA	Miliamperes
MFM	Maturação da falange média do terceiro dedo
MPS1-5	<i>Maturational Phalanx Stage 1-5</i> (Estágios de Maturação da Falange média de 1-5)
MS	Mariana Sobral (avaliador)
MVC	Maturação das Vértebras Cervicais
ng/l	Nanograma/Litro
nm	Nanômetros
PBS	<i>Phosphate Buffered Solution</i> (Tampão-Fosfato Salino)
rpm	Rotações por minuto
S	Segundos
SCP	Surto de Crescimento Puberal
SNA	Ângulo formado pelos pontos Sela-Násio-A
SNB	Ângulo formado pelos pontos Sela-Násio-B

SPSS

Statistical Product and Service Solutions

.TIFF

Tagged Image File Format

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1	Metabolismo ósseo	17
1.1.1	Marcadores da aposição óssea	17
1.1.1.1	Colágeno tipo I	17
1.1.1.2	Osteocalcina	18
1.1.1.3	Fosfatase alcalina (FAL)	18
1.2	Crescimento esquelético	19
1.3	Métodos radiográficos de avaliação do crescimento	20
1.3.1	<u>Radiografia cefalométrica lateral</u>	20
1.3.1.1	Avaliação do crescimento da face através de linhas e ângulos cefalométricos	20
1.3.1.2	Maturação das vértebras cervicais (MVC)	21
1.3.2	<u>Radiografia de mão e punho</u>	22
1.3.3	<u>Maturação da falange média do terceiro dedo (MFM)</u>	24
1.3.4	<u>Radiografia panorâmica (maturação dental)</u>	24
1.4	Métodos não-radiográficos de avaliação do crescimento	25
1.4.1	<u>Modelos de gesso (idade dentária)</u>	25
1.4.2	<u>Idade cronológica</u>	26
1.4.3	<u>Avaliação da quantificação/atividade enzimática de biomarcadores do crescimento ósseo</u>	26
1.4.3.1	Serum sanguíneo	26
1.4.3.2	Fluido gengival crevicular	28
1.4.3.3	Saliva	28
2	PROPOSIÇÃO	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	Aspectos éticos	31
3.2	Tipo de estudo e seleção da amostra	31
3.2.1	<u>Critérios de inclusão/exclusão</u>	31
3.3	Procedimentos clínicos	32

3.4	Protocolo de aquisição da saliva	32
3.5	Processamento das amostras de saliva e análise dos níveis da fosfatase alcalina	33
3.5.1	<u>Determinação da concentração da fosfatase alcalina óssea</u>	33
3.6	Obtenção e processamento das radiografias	33
3.6.1	<u>Radiografia do terceiro dedo</u>	33
3.6.2	<u>Radiografia cefalométrica lateral</u>	34
3.6.3	<u>Processamento radiográfico e digitalização dos exames</u>	34
3.7	Calibração dos avaliadores	34
3.8	Análise da radiografia do terceiro dedo	35
3.9	Análise da radiografia cefalométrica lateral	36
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4.1	Cálculo amostral e erro de método	38
4.2	Análise dos dados	38
5	RESULTADOS	39
6	DISCUSSÃO	42
	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	59
	APÊNDICE B – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido	60
	ANEXO A – Manual do kit de análises	61
	ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	64

INTRODUÇÃO

Identificar a fase de crescimento dos pacientes ortodônticos é fundamental para se escolher os melhores momento e estratégia de intervenção. Esta tomada de decisão é ainda mais importante no tratamento de pacientes classe II, pois é fundamental conhecer o momento do surto de crescimento da mandíbula para se decidir a melhor forma de direcionar seu crescimento.¹⁻³

Tradicionalmente, a avaliação da fase de crescimento é efetuada através de exames radiográficos, que permitem avaliar os diferentes estágios da maturação das vértebras cervicais (radiografia cefalométrica lateral), dos germes dentários (radiografia panorâmica) e dos centros de ossificação/fechamento epifisários dos ossos da mão e do punho (radiografia de mão e punho). A avaliação da dentição (decídua/mista/permanente, através de modelos de gesso) e a idade cronológica também fornecem dados que contribuem para esta análise, porém apresentam pouca confiabilidade.⁴

Dentre os métodos radiográficos, a análise da maturação das vértebras cervicais, através das radiografias cefalométricas laterais, e a análise carpal são os métodos mais usados na Ortodontia.^{5,6} Na análise da maturação proposta por Baccetti, há seis diferentes estágios de maturação das vértebras cervicais 2, 3 e 4, que compreendem três estágios: pré-pico, pico e pós-pico de crescimento puberal.⁵ Em relação a análise carpal, as análises mais recorrentes em estudos sobre o tema são as de Greulich e Pyle e Fishman.^{6,7} Entretanto, a recomendação mais recente de entidades da classe ortodôntica é a de dispensar o uso das radiografias de mão e punho para avaliação do crescimento, por ser um exame radiográfico adicional na documentação ortodôntica.⁸

Uma alternativa a este exame seria a avaliação da maturação da falange média do terceiro dedo, observada a partir de um exame periapical.⁹ Esta avaliação apresenta boa correlação com o método de maturação vertebral, além de oferecer menor radiação quando comparada à de mão e punho, por exemplo. Sua obtenção é feita através de aparelho de radiográfico dental convencional, encontrados em consultórios e clínicas odontológicas particulares, assim como em instituições de ensino, o que facilita o acompanhamento longitudinal do crescimento.¹⁰

Entretanto, ao se buscar alternativas não-radiográficas para a avaliação e acompanhamento do crescimento, os marcadores do metabolismo ósseo são tidos como promessas de detecção comparável a das radiografias, prescindindo de radiação.

Os marcadores do crescimento ósseo mais relatados na literatura com o intuito de quantificar o crescimento são o IGF-1 e a fosfatase alcalina. O primeiro fora quantificado apenas no soro sanguíneo, enquanto há estudos relatando a quantificação da fosfatase no sangue, fluido gengival crevicular e saliva.¹¹⁻¹² Esta última apresenta vantagens em relação ao fluido e ao sangue pela relativa simplicidade na técnica e processamento das amostras, além de ser um método não-invasivo, o que pode facilitar a adesão de pacientes mais jovens e seus responsáveis.

Os trabalhos publicados que avaliaram a correlação dos níveis ou da atividade da fosfatase alcalina na saliva correlacionaram-nos apenas com um exame radiográfico ou mesmo a associação deste com idade cronológica, um indicador pouco confiável do crescimento ósseo.¹²⁻¹⁶ O objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis da isoforma óssea da fosfatase alcalina, enzima que está diretamente relacionada ao processo de mineralização óssea e correlacioná-los aos estágios de crescimento (pré-pico, pico e pós-pico de crescimento puberal). Estes estágios foram determinados através da maturação das vértebras cervicais, avaliada em radiografias cefalométricas, e da maturação da falange média do terceiro dedo, avaliada em película radiográfica tipo 2 (usada para tomadas periapicais).

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Metabolismo ósseo

O tecido ósseo está em processo de constante remodelação através dos processos antagônicos de aposição e reabsorção, que estão comumente em equilíbrio. Tal equilíbrio é possível através de regulação de hormônios sistêmicos (paratormônio e vitamina D) e biomarcadores locais (citocinas e fatores de crescimento).¹⁵

Os biomarcadores locais são classificados de acordo com a sua função no processo metabólico: formação ou reabsorção. Os indicadores de reabsorção óssea estão relacionados aos produtos da quebra do colágeno, como a hidroxiprolina ou diversos colágenos de ligação cruzada e telopeptídeos. Outros marcadores da reabsorção são proteínas de matriz não-colagenosa, como sialoproteínas ósseas ou enzimas osteoclasto-específicas como fosfatase ácida ou catepsina K.¹

O processo de aposição óssea, comandado pelos osteoblastos, tem os seguintes biomarcadores como indicadores de suas funções: colágeno tipo I, envolvido na produção de precursores de novos osteoblastos; fosfatase alcalina, ativa na fase de maturação da matriz extracelular, osteocalcina e osteopontina, responsáveis pela mineralização.¹⁶

1.1.1 Marcadores da aposição óssea

1.1.1.1 Colágeno tipo I

É um tipo de colágeno fibrilar sendo a proteína mais abundante da matriz relacionada a mineralização óssea.¹⁷

Junto a outras variantes de colágeno (tipos II, III, V e XI) o tipo I está organizado em fibrilas e é encontrado em tecidos capazes de resistir a tensão, forças de cisalhamento e compressão, como tendões, ossos, cartilagens e pele.¹⁸

1.1.1.2 Osteocalcina

A osteocalcina é uma pequena proteína produzida pelos osteoblastos durante a mineralização da matriz, com sua expressão controlada pela vitamina D, o que a torna capaz de ligar ao cálcio.¹⁹ Também interage com outras proteínas, incluindo receptores de superfície celular. Esta função faz com que a osteocalcina seja uma molécula ativa no processo de organização da matriz extracelular.¹

A maior parte da osteocalcina é produzida e incorporada a própria matriz óssea onde se liga a hidroxiapatita. Apenas uma porcentagem menor (variação de 10 a 30%) está disponível na circulação sanguínea. Entretanto, a concentração desta proteína no sêrum é um marcador sensível da formação óssea.²⁰ Apesar deste fato, a instabilidade desta molécula no sangue dificulta estabelecer um padrão para a medição de seus níveis através de kits de análise imunoenzimática, havendo variações em diferentes métodos.²¹

1.1.1.3 Fosfatase alcalina (FAL)

É uma proteína plasmática ligada à membrana que pode se apresentar em quatro diferentes isoformas: intestinal, placentária, de células germinativas e de tecidos não-específicos, como as produzidas no fígado, ossos e rins.

A fosfatase alcalina óssea (FAO) é uma enzima relacionada a fase de aposição óssea, sendo responsável pelo processo de mineralização óssea através do aumento dos cristais de hidroxiapatita. Esta enzima pode também inativar um dos agentes inibidores da calcificação, a osteopontina. É um homo dímero ancorado a membrana dos osteoblastos e as vesículas matriciais. Após sua quebra por uma fosfolipase, a FAO é liberada na circulação e pode ser então usada como marcador da formação óssea.²²

Em indivíduos saudáveis, a FAO predomina em relação as outras isoformas na infância e adolescência, enquanto a isoforma do fígado predomina na vida adulta, ou se apresenta na mesma proporção da óssea. Em situações não-fisiológicas, como calcificação vascular, câncer ósseo e doença de Paget, há também o predomínio de isoforma óssea.²³

1.2 Crescimento esquelético

A definição de crescimento refere-se às mudanças da quantidade de matéria biológica, enquanto o desenvolvimento engloba as capacidades de crescimento, diferenciação (mudança em qualidade) e deslocamento (mudança de posição). Ainda há o processo de maturação, relativo às alterações qualitativas, que ocorrem com o amadurecimento ou idade. Um exemplo de processo de maturação é a puberdade, que comumente responde ao pico de crescimento.²⁴ Todas estas etapas fazem parte das transformações ocorridas ao longo da vida do ser humano e fazem parte do acompanhamento dos pacientes odontológicos/ortodônticos, especialmente o crescimento dos maxilares. O interesse é justificado pela possibilidade de se intervir com objetivo de controlar a progressão das deformidades esqueléticas, como as más-oclusões de classe II ou III. Para tal, é necessário entender o processo de formação e conhecer o(s) período(s) de maior desenvolvimento destes ossos.

A mandíbula e a maxila são respectivamente os segundo e terceiro ossos a iniciarem o processo de ossificação na fase embrionária.²⁵ Ambos ossos são desenvolvidos a partir dos primeiro e segundo arcos branquiais, processo iniciado na quinta semana embrionária, e apresentam ossificação do tipo intramembranosa.

Comparando os períodos de crescimento de ambos maxilares, Laowansiri e Liu e col. acompanharam, através de radiografias cefalométricas laterais, pacientes não tratados ortodonticamente dos 4 meses de vida aos 16 anos de idade.^{26,27} Nestes estudos, foram avaliadas radiografias cefalométricas laterais, onde se caracterizou o desenvolvimento mandibular e maxilar, remodelamento e maturação mandibulares. Como resultados, observou-se que a maxila apresenta seu maior potencial de crescimento e alterações dimensionais no primeiro ano de vida, especialmente no sentido ântero-posterior e em relação à maturação óssea. A mandíbula o faz até os seis primeiros meses pós-natais, apresentando desaceleração nas taxas de crescimento e gradiente de maturação durante a primeira infância, resultado semelhante obtido no trabalho de Hagg e Taranger.

Os potenciais de crescimento da maxila e mandíbula já foram comparados também de acordo com diferentes alterações esqueléticas da face. Em um estudo comparativo entre o crescimento craniofacial de pacientes classe I e II sem tratamento ortodôntico prévio, foram avaliados pacientes entre 9 e 18 anos de idade.²⁸ Não houve diferenças significativas no crescimento dos grupos, com ambos apresentando aumento dos ângulos SNA e SNB, redução do ANB e ângulo goníaco. Em contrapartida, o estudo de Stahl e colaboradores demonstrou semelhanças no padrão de crescimento craniofacial entre os pacientes Classe I e II, exceto por

um menor aumento no comprimento mandibular dos classe II em relação aos de classe I, o que é observado desde o pico de crescimento mandibular até a fase pós-puberal.²⁹

No estudo de Wolfe e colaboradores que envolveu pacientes dos 6 aos 16 anos, foi detectada piora na relação ântero-posterior de maxila/mandíbula, com tendência de crescimento mandibular excessivo, especialmente em meninos.³⁰ Em estudos comparativos de pacientes em crescimento com padrões esqueléticos do tipo I e III, os últimos apresentaram valores menores de ANB e mandíbulas mais hiperdivergentes e largas, quando comparados aos pacientes classe I.³³⁻³⁶ Outro diferencial dos pacientes classe III é o crescimento residual mandibular, mesmo após o pico puberal, quando comparado ao da maxila.³⁵

A avaliação das diferenças e similaridades do crescimento da maxila e da mandíbula é feita predominantemente através do acompanhamento das radiografias cefalométricas de forma longitudinal. Entretanto, tão importante quanto a comparação das alterações esqueléticas ao longo do tempo, é avaliar em que etapa do crescimento o paciente está, o que torna as decisões sobre o melhor momento e qual a melhor estratégia de intervenção mais precisas.

1.3 Métodos radiográficos de avaliação do crescimento

1.3.1 Radiografia cefalométrica lateral

1.3.1.1 Avaliação do crescimento da face através de linhas e ângulos cefalométricos

Uso de medidas lineares e angulares para, através de superposições das radiografias, avaliar o crescimento ósseo. Não existem medidas-padrão definidas, a escolha fica a critério do tipo de avaliação desejada, seja de crescimento dos ossos da face em seu padrão horizontal, vertical ou ambos. Como exemplos, tem-se as seguintes análises:

- Superposição craniofacial ou total: quando se sobrepõem os traçados na linha Sela-Násio (SN), com registro no ponto Sela (S), para avaliar o crescimento geral da face e alterações do tratamento.

- Superposição parcial/total de maxila: quando se sobrepõem os traçados no plano palatal, com registro no ponto espinha nasal anterior (ENA), para avaliar o movimento dos dentes superiores.³⁶

- Superposição parcial/total de mandíbula: quando se sobrepõem os traçados no contorno da cortical interna da sínfise com melhor sobreposição no limite inferior do corpo mandibular,

para avaliar o movimento dentário na arcada inferior e crescimento da mandíbula.³⁷⁻³⁹

1.3.1.2 Maturação das vértebras cervicais (MVC)

A análise da maturação das vértebras cervicais (MVC) é um método baseado na avaliação do formato das vértebras cervicais, visualizadas na radiografia cefalométrica lateral. Uma vantagem relevante deste método é não necessitar de uma radiografia adicional no início do tratamento, já que a radiografia cefalométrica lateral é rotineiramente usada tanto para os diagnósticos de padrões esqueléticos e dentários, como também para avaliação de crescimento.

O método, descrito inicialmente por Lamparski, consiste na avaliação dos seis estágios de maturação das vértebras cervicais, em relação às suas altura e largura, que podem ser identificados durante o período puberal.⁴⁰ Em seu estudo, Lamparski avaliou 141 radiografias laterais de pacientes de ambos os sexos, com idades entre 10 e 15 anos, na tentativa de se criar um padrão de amadurecimento das vértebras cervicais. A idade esquelética foi determinada a partir da radiografia de mão e punho, usando os métodos propostos por Greulich and Pyle e Todd.^{6,41} O autor propôs que fossem avaliadas as vértebras de C2 até a C6. Foi encontrada boa correlação entre a avaliação vertebral e a carpal, sugerindo que deveriam ser feitos estudos longitudinais sobre o tema. Nesta análise, os padrões de cada uma das seis fases de maturação foram divididos de acordo com os gêneros feminino/masculino, levando em consideração a idade cronológica dos pacientes.

Diversos estudos foram desenvolvidos desde a criação de tais padrões de maturação, porém apenas em 1995 Hassel e Farman desenvolveram um método de análise levando em consideração apenas as vértebras C2, C3 e C4.⁴⁴ Sua justificativa para a redução do número de vértebras analisadas foi a similaridade encontrada de C3-C7, o que não justificaria uma análise de maior número de vértebras, simplificando a técnica.

O método proposto por Lamparski foi modificado por Franchi e col. em 2000.⁴⁵ Neste estudo, os autores removeram as correlações dos estágios de maturação vertebral com idade cronológica e sexo, porém faziam a avaliação das cinco primeiras vértebras cervicais. O mesmo grupo de autores, em 2002, fez uma nova modificação do método, o qual agora apresentava cinco estágios, devido a união das fases 3 e 4 do método prévio. A avaliação passou a ser apenas das três primeiras vértebras, como proposto por Hassel e Farman em 1995.⁴⁶

Baccetti e col propuseram, em um estudo no ano de 2005, um mesmo parâmetro de

avaliação de formato das vértebras cervicais de meninos e meninas, sem considerar a idade cronológica dos pacientes.⁵ Neste trabalho, mantiveram o padrão de seis estágios de maturação. Os estágios contemplam três fases do crescimento puberal: antes do surto (estágios 1 e 2), durante o surto (estágios 3 e 4) e após o surto (estágios 5 e 6).

Diversos estudos foram realizados aplicando o método de análise da maturação vertebral e avaliando a reprodutibilidade da técnica. De acordo com Franchi, Baccetti e Rainey, o método MVC apresenta boa confiabilidade.^{32,45,47} No estudo de Rainey, foram testadas as reprodutibilidades de avaliação intra e inter-observadores, onde encontrou-se boa concordância entre ambas, assim como no estudo de Perinetti, que destaca que quando há um treinamento específico, a análise da MVC é um método confiável e reprodutível de avaliação do estágio de crescimento.^{31,47} Tal afirmativa foi corroborada pelo estudo de Rongo e col, que avaliou se a experiência clínica na área de Ortodontia afetaria a reprodutibilidade do método MVC.⁴⁸ Três grupos foram recrutados para a pesquisa: o primeiro formado por alunos de Odontologia com menos de um ano de experiência em Ortodontia, estudantes de pós-graduação, com dois a quatro anos de experiência ortodôntica e especialistas com mais de sete anos na área. Como resultado, o grupo com menos de um ano de experiência em Ortodontia foi o que apresentou melhores correlações intra e inter-observador. A justificativa para tal fato foi que no último ano de graduação, o grupo de recém-formados recebeu treinamento intensivo sobre a técnica.

Em contrapartida aos estudos supracitados, foi demonstrado que o método de análise das vértebras cervicais apresenta baixa reprodutibilidade, tanto nas avaliações intra quanto inter observador, concluindo que este método não deve ser o único método diagnóstico para avaliar o estágio do crescimento.^{36,49-51}

1.3.2 Radiografia de mão e punho

Para avaliação da maturidade óssea e previsão do estágio do crescimento da criança e do adolescente o método de avaliação mais tradicional na Ortodontia é a análise da radiografia de mão e punho. Neste, o cálculo da idade média de acordo com o aparecimento de cada um dos diversos centros de ossificação, ou o fechamento epifisário e suas variações nestas idades.

A técnica descrita por Greulich e Pyle é baseada em um atlas padrão de comparação, composto de radiografias de mão e punho “típicas” de acordo com um intervalo de seis meses

de idade cronológica.⁶ A radiografia do paciente teria então de ser comparada às radiografias-padrão do atlas, para se atribuir a este uma idade em meses (idade média). O método de Tanner e col. também utiliza um método de comparação com radiografias-padrão da maturidade esquelética de pacientes considerados normais e com algumas características similares, como idade e sexo. Os ossos individuais são classificados usando um sistema de escores de ponderação biológica, para assim designar uma “idade esquelética”.⁵²

Em 1977, Martins e Sakima propuseram um método através do gráfico da curva do surto de crescimento puberal (SCP) com a sequência da fase de mineralização dos centros de ossificação dos ossos da mão e do punho, determinando se a taxa de crescimento está na fase ascendente ou descendente.⁵³

O método de avaliação de Fishman, proposto em 1982, tem sido o mais utilizado na avaliação das radiografias de mão e punho. Consiste na avaliação da maturação esquelética baseada em indicadores de maturação esquelética, que abrangem todo o período de desenvolvimento na adolescência. Tais indicadores estão localizados em seis sítios anatômicos do polegar, dedos médio, mínimo e o osso radio, provendo gráficos e tabelas que estimam a taxa de crescimento médio e porcentagem do crescimento total completado. Estes valores são independentes da idade cronológica.⁷

Apesar do método de avaliação do crescimento em radiografias de mão e punho ainda ser amplamente usado no ensino e prática clínica de Ortodontia, questiona-se a necessidade de solicitar um exame radiográfico adicional aos pacientes, somente com o intuito de avaliar o crescimento. Esta questão é discutida no estudo de Verna e col, onde foi avaliada a validade deste método como diagnóstico da etapa de crescimento puberal.⁵⁴ Foi encontrada variabilidade na correlação com o crescimento ósseo, visto que cada paciente apresenta um padrão diferente de crescimento, não justificando a exposição radiográfica adicional.

Quando comparado ao método de análise da maturação das vértebras cervicais, a literatura disponível é controversa. Segundo Flores-Mir, existe uma relação moderadamente alta entre as avaliações das vértebras cervicais e as radiografias de mão e punho, resultado semelhante ao encontrado por Gandini e col.^{55,56} Entretanto, estes resultados diferem do encontrado por Beit e col, onde a partir das radiografias de mão e punho, foram calculadas as idades dos pacientes, segundo o método de Greulich e Pyle.⁵⁷ As idades esqueléticas, obtidas a partir das radiografias, foram comparadas a maturação das vértebras cervicais, através dos seguintes parâmetros: concavidades de C2, C3 e C4; altura anterior de C3 e C4 e o ângulo entre as bordas superiores de C3 e C4. Como resultado, foi obtido que o grau de concordância entre a idade esquelética calculada pelo método da análise da maturação vertebral e a obtida através do

método de Greulich e Pyle foi inferior ao obtido entre a idade cronológica e a análise carpal.

1.3.3 Maturação da falange média do terceiro dedo (MFM)

Estudos prévios sobre o método de avaliação das radiografias de mão e punho trouxeram indicativos de que a maturação da falange média do terceiro dedo pode ser usada como indicador da maturação esquelética.^{58,59} É possível detectar a maturação desta área através de um exame radiográfico feito com uma película número 2, usada em tomadas periapicais.

A primeira descrição dos estágios de maturação da falange média foi feita em 1972 no estudo de Fishman.⁷ No trabalho de Perinetti e col foi feita uma descrição modificada, separando em seis fases específicas.¹⁰ O mesmo autor publicou um outro estudo, em 2017, com uma atualização que compactou as fases 3 e 4, trazendo uma avaliação em cinco e não mais seis fases.⁶⁰ Foram usadas como referências as análises carpais de Hagg e Taranger e Rajagopal.^{59,61,62} No estudo de Perinetti, foi avaliada a confiabilidade do método em relação ao surto de crescimento mandibular. Como resultado, observou-se que o estágio MPS2 apresenta acurácia satisfatória na identificação da fase iminente ao pico de crescimento mandibular. Entretanto, houve grande variabilidade da incidência desta fase em pacientes mais velhos, sugerindo a necessidade de se usar este método associado a outros na detecção da fase de crescimento.

Um outro estudo sobre o uso da maturação de partes específicas da mão foi o de Leite e col, que avaliou a correlação dos dados esqueléticos encontrados na avaliação radiografia de mão e punho por completo quando comparados aos encontrados apenas na análise dos dedos polegar, indicador e dedo médio.⁶³ O resultado encontrado foi que a análise apenas destes três dedos oferece resultados tão precisos quanto a radiografia de mão e punho, com a vantagem de se expor o paciente a uma menor dose de radiação.

1.3.4 Radiografia panorâmica (maturação dental)

A avaliação da maturação/ estágio de calcificação dentária apresenta-se como mais uma alternativa para a análise da idade esquelética de pacientes em crescimento. A vantagem deste método é ser baseada em radiografias panorâmicas, que são solicitadas de maneira rotineira na clínica de Ortodontia. Os dentes mais comumente usados nesta tentativa de correlação com a idade esquelética são os caninos, pré-molares e segundos molares. Estes dentes são

preferíveis por terem seus estágios de maturação correlacionados ao período de crescimento puberal, enquanto a maturação de incisivos e primeiros molares estão no período prévio ao surto, e os terceiros molares após o surto de crescimento. Outro fator a ser considerado é a preferência pela avaliação dos dentes inferiores, pela sobreposição de imagens no arco superior (em radiografias panorâmicas), o que pode dificultar uma visualização clara da fase de calcificação.⁶⁴

Uma metanálise conduzida por Perinetti e col. reuniu e comparou diversos estudos disponíveis sobre a correlação da maturação dentária, usando o método de análise proposto por Dermijan e col. com a análise de maturação das vértebras cervicais, segundo os métodos propostos por Hassel e Farman ou Baccetti.^{44,45,65,66} Os estudos incluídos na metanálise apresentavam qualidade de baixa a moderada. Concluiu-se que, apesar dos diversos estudos afirmarem existir uma boa correlação entre a fase do crescimento obtida através da maturação das vértebras e os estágios de maturação dentária, este último não é recomendado para tal avaliação.

1.4 Métodos não-radiográficos de avaliação do crescimento

1.4.1 Modelos de gesso (idade dentária)

A avaliação das fases do desenvolvimento da dentição (decídua, mista precoce, mista tardia e permanente) é um mecanismo de predição da idade com uso difundido, apesar de existir pouca evidência disponível sobre sua confiabilidade. As fases da dentição têm sido usadas especialmente na investigação dos resultados de protocolos de tratamento precoce versus tardio em pacientes com más oclusões Classe II ou III de Angle, com resultados controversos.

Quando comparado à avaliação da maturação das vértebras cervicais, um estudo de Franchi e col. concluiu que a fase da dentição mista precoce (esfoliação dos incisivos decíduos, erupção dos primeiros molares e incisivos permanentes) mostra maior valor diagnóstico para a identificação da fase esquelética pré-puberal (CS1), enquanto a dentição mista intermediária (incisivos e primeiros molares permanentes e os outros dentes decíduos) apresenta pouco valor diagnóstico nesta fase.⁶⁷ Nem a dentição mista tardia (esfoliação de caninos e molares decíduos, erupção de caninos permanentes e pré-molares) ou a dentição permanente precoce (presença de todos os dentes permanentes, exceto os terceiros molares) são indicadores válidos para a fase de pré-pico puberal (CS3).

1.4.2 Idade cronológica

A avaliação da idade cronológica como indicador biológico da maturação esquelética também é pouco confiável, devido principalmente à extensa variabilidade individual quando correlacionada aos eventos próximos à puberdade.⁴⁴ Entretanto, apesar da pouca confiabilidade do método como de avaliação da maturidade esquelética, a idade cronológica tem sido usada como fator de inclusão/exclusão para estudos que avaliam a efetividade do tratamento de pacientes em crescimento.⁶⁸⁻⁷⁰

Diversos estudos correlacionaram a idade cronológica com outros métodos de avaliação da idade esquelética, como a maturação das vértebras cervicais e a radiografia de mão e punho. Em um estudo que comparou a idade cronológica com as fases do crescimento, segundo a análise de maturação vertebral, Baccetti e col. sugeriram que em meninos, a idade cronológica pode identificar a fase pré-puberal e nas meninas, a fase pós-puberal.⁷¹ Tanto nos meninos quanto nas meninas, a idade cronológica não está correlacionada ao início do surto da maturação esquelética. Em relação às radiografias de mão e punho, segundo o estudo de Beit e col., a idade cronológica também não apresentou boa correlação quando comparada à análise destas radiografias pelo método de Greulich e Pyle, mesmo resultado obtido por Suri e col.^{57,72}

1.4.3 Avaliação da quantificação/atividade enzimática de biomarcadores do crescimento ósseo

1.4.3.1 Sérum sanguíneo

A literatura dispõe de muitos estudos em que se correlaciona os níveis ou mesmo a atividade de enzimas e metabólitos do corpo às diversas fases de crescimento ósseo. Dentre os metabólitos mais citados, tem-se o fator de crescimento semelhante a insulina 1, e a fosfatase alcalina.

a) **Fator de crescimento semelhante a insulina-1**¹

O fator de crescimento semelhante a insulina-1 é um hormônio polipeptídico produzido

¹ Do inglês *insuline-like growth fator-1* ou *IGF-1*

pelo fígado, em resposta ao estímulo do hormônio do crescimento. Está envolvido no crescimento de diversos órgãos e tem papel fundamental no crescimento pós-natal e especialmente no crescimento longitudinal dos ossos.⁷³

Alguns estudos buscaram correlações dos níveis deste hormônio no sêrum sanguíneo em busca de variações de acordo com a fase de crescimento. Tais estudos compararam os níveis hormonais aos achados obtidos através da maturação das vértebras cervicais.^{11,73-75} Como resultado, encontraram níveis aumentados nas fases de surto de crescimento puberal (estágios 3 e 4 de MVC), com variações entre meninos e meninas.

b) Fosfatase alcalina

A avaliação desta enzima no sêrum pode ser feita através de dois diferentes métodos: avaliação da atividade enzimática total, onde não há distinção das isoformas da FAL e ensaios imunoenzimáticos para se determinar a concentração desta enzima, nos quais se é possível alcançar maior especificidade da isoforma-alvo.⁷⁶⁻⁷⁸

A fosfatase alcalina óssea (FAO) apresenta níveis máximos de atividade nos primeiros seis primeiros meses de vida, com redução e estabilização dos valores entre dois e nove anos de idade, onde há um aumento variável na fase da puberdade. Após esta etapa, na faixa entre 18 e 20 anos, os indivíduos atingem os níveis de pacientes adultos.⁷⁹⁻⁸¹

Em um estudo feito para avaliar os níveis de marcadores do metabolismo ósseo em meninas no surto de crescimento, encontrou-se níveis de FAO dez vezes maior do que em pacientes adultos e níveis de atividade enzimática da FAL total cinco vezes maior.⁸²

Dois estudos avaliaram a relação dos níveis da fosfatase alcalina óssea (FAO) sanguínea com os estágios de crescimento determinados por Tanner-Whitehouse.^{52,83,84} Ambos estudos encontraram valores aumentados desta enzima nas fases de surto de crescimento puberal, com variação dos valores em relação a meninos e meninas, com o pico sendo mais tardio nos meninos. O estudo de Mora encontrou expressiva variação das concentrações da FAO de acordo com a fase do crescimento, independentemente da idade.⁸⁴ Os autores concluíram que é importante se comparar os valores de expressão da enzima com a idade cronológica, sexo e algum outro método que especifique as fases de crescimento.

1.4.3.2 Fluido gengival crevicular

O fluido gengival crevicular (FGC) é um exsudato biológico proveniente do epitélio do sulco gengival. A quantificação dos seus componentes é um método para identificar biomarcadores específicos com sensibilidade adequada, tanto para avaliação de modificações durante o tratamento ortodôntico, como das doenças periodontais e dos biomarcadores relacionados ao crescimento ósseo.⁸⁷⁻⁹⁰

Em um estudo retrospectivo comparativo da relação entre a atividade da FAL, as fases de maturação das vértebras cervicais e as fases da dentição (dentição mista intermediária, mista tardia e permanente), foram recrutados 100 pacientes com idade média de 11,5 anos.⁸⁹ As fases do crescimento puberal foram definidas em fases pré-puberal, de crescimento e pós-puberal, através das radiografias cefalométricas laterais. A atividade da FAL foi analisada através da coleta do FGC, feita nos sítios mesial e distal dos incisivos inferiores. Como resultado do estudo, foi reafirmada a fraca relação entre as fases da dentição com as fases de crescimento, segundo as radiografias laterais. Entretanto, a atividade enzimática da FAL encontrada no grupo da fase de crescimento puberal foi quase duas vezes maior que a dos outros grupos (pré e pós-puberal), com uma diferença estatisticamente significativa. Este resultado confirma a avaliação da atividade da fosfatase alcalina como um método diagnóstico da fase de crescimento puberal.

Perinetti e colaboradores compararam a relação entre a maturação das vértebras cervicais e o nível de FAL no fluido gengival crevicular de pacientes de 7 a 17 anos de idade.⁹⁰ O maior nível de atividade enzimática foi detectado nas fases CS3 e CS4, que correspondem ao pico de crescimento mandibular na análise da MVC. Como descrito por Szulc e col, a atividade do FAL, que é o biomarcador mais usado do metabolismo ósseo, aumenta durante a puberdade e diminui durante a vida adulta.¹⁹

1.4.3.3 Saliva

A saliva é uma secreção exócrina, sendo uma complexa mistura de fluidos originários das glândulas salivares, do fluido gengival crevicular (FGC) e sangue, contendo bactérias orais e debris de alimentos. Também são encontrados na saliva imunoglobulinas e outros fatores antimicrobianos, proteínas, enzimas, mucinas e produtos azotados, como ureia e amônia.⁹¹

A passagem destes compostos, quando originários do sangue, se dá através de diferentes modos: difusão passiva, transporte ativo e ultrafiltração. O método de difusão varia então de

acordo com o tamanho da molécula. A transudação dos compostos sanguíneos para a cavidade oral pode acontecer via FGC ou mesmo diretamente da mucosa oral.

O fluido salivar é um importante instrumento diagnóstico na detecção de doenças sistêmicas e no monitoramento da saúde geral. A saliva também se apresenta como uma fonte não-invasiva do metabolismo e eliminação de medicamentos. Frequentemente, a Periodontia usa a saliva como recurso diagnóstico para avaliar as alterações de biomarcadores dos metabolismos ósseo e tecidual, provocadas pela doença periodontal.⁹²⁻⁹⁴

A principal vantagem da coleta e análise de saliva como método de diagnóstico é a simplicidade da técnica, por prescindir de radiação e apresentar baixo custo de material.⁹⁵ Outras vantagens são um risco mínimo de contaminação durante a coleta e o fato de se usar a saliva em situações clínicas desafiantes, como a obtenção de amostras de crianças ou de pacientes ansiosos, onde a coleta de sangue geraria um problema.⁹⁶

Na Ortodontia, os níveis dos biomarcadores do metabolismo ósseo têm sido estudados como possibilidades promissoras para ampliar a compreensão sobre os fenômenos inerentes à remodelação óssea relacionada ao movimento ortodôntico e ao crescimento.^{14,16,98-101}

Os estudos publicados sobre os níveis da fosfatase alcalina na saliva ou sua atividade, fazem-no correlacionando a técnicas radiográficas de avaliação do crescimento. No primeiro deles, publicado em 2015, Tarvade e col compararam se há diferentes níveis da FAL nos diferentes estágios de maturação da falange média do terceiro dedo. Foi detectado maior nível médio de concentração da enzima na fase correspondente ao pico de crescimento, a fase G, segundo a análise de Hagg e Taranger, com subsequente decréscimo nas fases pós-surto.^{13,59} O estudo de Wijaya e col. comparou os níveis especificamente da fosfatase alcalina óssea em relação a diferentes fases do crescimento encontradas pela maturação das vértebras cervicais, em acordo com o método de Bacetti e col.^{14,45} Os achados de tal trabalho revelaram não haver correlação significativa entre os níveis da FAO e as fases de MVC, com o pico dos níveis da enzima na fase pré-puberal e não no surto. Por último, o trabalho de Alhazmi e col investigou a relação da atividade da FAL, concentração proteica e idade cronológica com os estágios de MVC propostos por Bacetti e col.^{12,45} O pico da atividade enzimática foi encontrado nas fases pré-puberais, havendo boa relação entre a idade cronológica e as fases de MVC.

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo tem como proposta avaliar os níveis de expressão da enzima fosfatase alcalina óssea na saliva de pacientes, em diferentes estágios de crescimento, tendo como objetivos específicos:

1 - Avaliar a concentração da FAO presente na saliva e se há diferença entre os diferentes estágios de maturação vertebral e da falange;

2 – Compará-los aos estágios de maturação das vértebras cervicais visualizadas em telerradiografias de perfil;

3 – Comparar ao estágio de maturação da falange média do terceiro dedo obtida em radiografia específica para este fim.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O projeto de Pesquisa foi submetido à Plataforma Brasil (CAAE: 16425819.0.0000.5259). O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CEP/HUPE), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) emitiu parecer substanciado número 3.550.517, data da relatoria: 03/09/2019 (ANEXO B).

3.2 Tipo de estudo e seleção da amostra

Realizou-se um estudo transversal, no qual foram selecionados pacientes entre 7 e 17 anos que buscaram tratamento ortodôntico na clínica de Ortodontia ou Odontopediatria da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. A seleção aconteceu no período de novembro de 2018 a outubro de 2019. Após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 65 pacientes, de acordo com o cálculo amostral.

3.2.1 Critérios de inclusão/exclusão

- Idade entre 7 e 17 anos;
- Bom estado geral de saúde, com ausência de alterações metabólicas, como alterações na produção do hormônio do crescimento, asma, problemas cardiovasculares e doença renal crônica, sendo tais alterações descartadas através da anamnese;
- Não ter feito uso de agentes antiinflamatórios ou antibióticos nos três meses prévios à coleta;
- Profundidade de bolsa periodontal ≤ 4 mm para toda a dentição;
- Índice de placa e de sangramento gengival $\leq 25\%$ em toda a boca.

3.3 Procedimentos clínicos

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, os pacientes e seus responsáveis legais assinaram os termos de assentimento e consentimento, respectivamente. (Apêndices A e B)

Seguinte ao recrutamento dos pacientes, foi feito um exame periodontal com avaliação da presença de placa visível, índice de sangramento gengival e medição da profundidade a sondagem.^{101,102} Estes procedimentos eram necessários para descartar a presença de doença periodontal, já que tal condição pode apresentar alterações nos níveis de fosfatase alcalina.^{103,104}

Após a realização dos índices, os pacientes receberam terapia periodontal adequada e as devidas instruções de higiene oral, pelo menos sete a dez dias antes da coleta da saliva. Na instrução de higiene, os pacientes eram orientados a escovar os dentes três vezes ao dia e fazer uso diário do fio dental. Este prazo foi estabelecido no intuito de, em caso de inflamação gengival, os níveis dos marcadores inflamatórios fossem restabelecidos a normalidade, incluindo a fosfatase alcalina. No intervalo entre a terapia periodontal e a coleta, os pacientes foram orientados a não ingerir medicamentos antiinflamatórios e/ou antibióticos, exceto em caso de manifestação do sintoma de alguma doença. Caso houvesse esta necessidade de ingerir alguma medicação, o paciente era excluído da amostra.

3.4 Protocolo de aquisição da saliva

No dia da coleta da saliva, os pacientes foram instruídos a não se alimentarem, ingerirem água e não deveriam escovar os dentes uma hora antes da coleta. Todos realizaram um bochecho com água gelada para remover quaisquer resíduos alimentares trinta minutos antes da coleta, feita entre as nove e onze da manhã.^{105,106}

Os participantes foram orientados a se manter em posição vertical na cadeira odontológica e a dispensar a saliva, de forma passiva, em tubos plásticos graduados e estéreis, imersos em gelo.¹⁰⁷ Não houve estímulo químico ou mecânico para a expectoração salivar, nem contagem de tempo máximo para se obter cinco mililitros de amostra.¹⁰⁸

Após a coleta, cada paciente recebia um número de identificação, o mesmo que era usado para identificar as radiografias deste mesmo indivíduo. Este número seguia a ordem cronológica das coletas, ou seja, o primeiro paciente recebeu o número 1, o segundo o 2, e

assim sucessivamente até o paciente 65.

3.5 Processamento das amostras de saliva e análise dos níveis de fosfatase alcalina

Imediatamente após a coleta, a saliva foi levada para a centrifugação no laboratório (Centrífuga NT 800, Novatecnica, Piracicaba, SP – Brasil). O processo de centrifugação era de 15 minutos, feitos em 6000 rotações por minuto (rpm) ou 3024 gramas. Os sobrenadantes foram separados em volumes de dois mililitros e congelados em um *freezer* a -80°C até as amostras serem processadas. A saliva clarificada foi armazenada sem diluição ou inibidor de protease, conforme solicitado pelo fabricante do *kit* de análise.

3.5.1 Determinação da concentração da fosfatase alcalina óssea

Todas as amostras foram descongeladas antes do início do processo e diluídas na proporção 1:4 (25 µL de saliva para 75 µL de PBS). Para a mensuração dos níveis de FAO, foi selecionado um *kit* com especificidade para fluidos corporais humanos denominado “Human Bone Alkaline Phosphatase, BALP ELISA Kit” (MyBioSource, Southern California, San Diego - EUA). Os níveis da FAO foram medidos através de um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), cujo passo a passo está no Anexo A. Após este processo, as amostras foram lidas quanto a sua densidade óptica em um espectrofotômetro de 450 nm (TP Reader, ThermoPlate).

3.6 Obtenção e processamento das radiografias

3.6.1 Radiografia do terceiro dedo

As radiografias foram feitas em equipamento de radiografias para tomadas periapicais com as devidas configurações (55kv, 500s e 8mA), estando a falange centralizada no filme. Estas radiografias foram feitas no mesmo dia da coleta de saliva. Todos os pacientes estavam protegidos por avental de chumbo com colar de tireóide.

3.6.2 Radiografia cefalométrica lateral

As radiografias foram feitas no período de 60 dias antes ou após a coleta de saliva, de forma a não haver espaço de tempo muito grande entre sua tomada e a coleta.

3.6.3 Processamento radiográfico e digitalização dos exames

As radiografias do terceiro dedo foram reveladas de forma manual, ficando por 40 segundos no revelador, com posterior lavagem em água e 60 segundos no fixador. Após a revelação, as radiografias eram lavadas com água. As radiografias cefalométricas laterais eram obtidas em aparelhos digitais de radiografias, com especial atenção à posição da cabeça para não cortar as vértebras C2-C4.

Após o processamento, as imagens eram digitalizadas em um *scanner* fotográfico HP Photosmart 4890 (Hewlett-Packard - Palo Alto, Califórnia, EUA), com as configurações de resolução em 300 dpi e 256 tons de cinza. Todo processo de digitalização foi feito por um mesmo profissional calibrado para tal tarefa.

Após digitalização, as imagens foram processadas no software Adobe Photoshop® (Adobe Inc. - San José, Califórnia, EUA) para remoção das informações dos pacientes, que porventura estivessem impressas nas radiografias cefalométricas laterais. Todas as radiografias foram então salvas em formato .TIFF, para manter a qualidade de imagem.

3.7 **Calibração dos avaliadores**

Dois operadores (MS e GP) avaliaram todas as radiografias de forma independente, estando cegos às informações dos pacientes, como nome, sexo e idade. A operadora MS avaliou treze radiografias (20% da amostra) de cada tipo, selecionadas de forma aleatória. Após quinze dias, estes mesmos exames foram reavaliados para testar a confiabilidade da técnica. O avaliador GP não realizou a calibração antes de avaliar os exames por estar previamente calibrado para as técnicas, como demonstrado em outros estudos.^{4,10,59,87,106}

No momento da avaliação dos exames, ambos os avaliadores estavam com as imagens e descrições correspondentes aos estágios de maturação vertebral e dos dedos em mãos. (figuras

1 e 2). Após as avaliações individuais, o avaliador GP conferiu os estágios atribuídos por MS, para checar a acurácia.¹⁰⁹

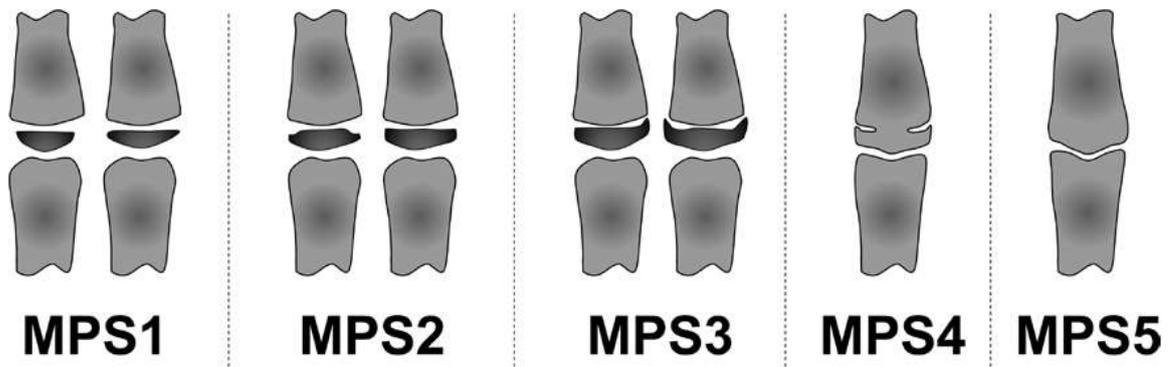
3.8 Análise da radiografia do terceiro dedo

A avaliação da maturação da falange média do terceiro dedo foi feita a partir de uma radiografia periapical da região. A análise utilizada foi a proposta por Perinetti e col.⁶⁰, dividida em três grupos de maturação: pré-puberal (MPS1-MPS2), surto (MPS3) e pós-surto (MPS4-MPS5).

A análise consiste nos seguintes estágios (Figura 1):

- MPS1: quando a epífise é mais estreita que a metáfise ou quando a epífise tem a mesma largura da metáfise, mas com ambas cônicas e de bordas laterais arredondadas. Epífise e metáfise não estão fusionadas.
- MPS2: a epífise é pelo menos da mesma largura da metáfise, com as laterais aumentando de espessura e mostrando uma clara demarcação no ângulo direito, com ou sem degraus laterais no contorno superior. Em caso de assimetria entre os dois lados, o lado mais maduro é usado para especificar o estágio.
- MPS3: a epífise é da mesma largura ou mais larga que a metáfise, com as laterais mostrando um capeamento inicial em relação à metáfise. Em caso de assimetria entre os dois lados, o lado mais maduro é usado para definir o estágio. Epífise e metáfise não estão fusionadas.
- MPS4: a epífise começa a fusão com a metáfise, apesar de seu contorno ser claramente reconhecível. Ambos os lados da epífise formam um ângulo obtuso com a borda distal e o capeamento pode ser detectável.
- MPS5: epífise e diáfise totalmente fusionadas.

Figura 1 - Representação esquemática dos diferentes estágios de maturação óssea da falange média do terceiro dedo



Fonte: Perinetti et al⁶⁰

3.9 Análise da radiografia cefalométrica lateral

A análise de Baccetti e col. consiste na avaliação e classificação dos diferentes estágios de maturação de três vértebras cervicais (C2, C3 e C4), visualizadas na radiografia cefalométrica lateral. São seis estágios de maturação, agrupados nos períodos pré-surto (CS1 e CS2), de surto de crescimento puberal (CS3 e CS4) e pós-surto (CS5 e CS6).⁵

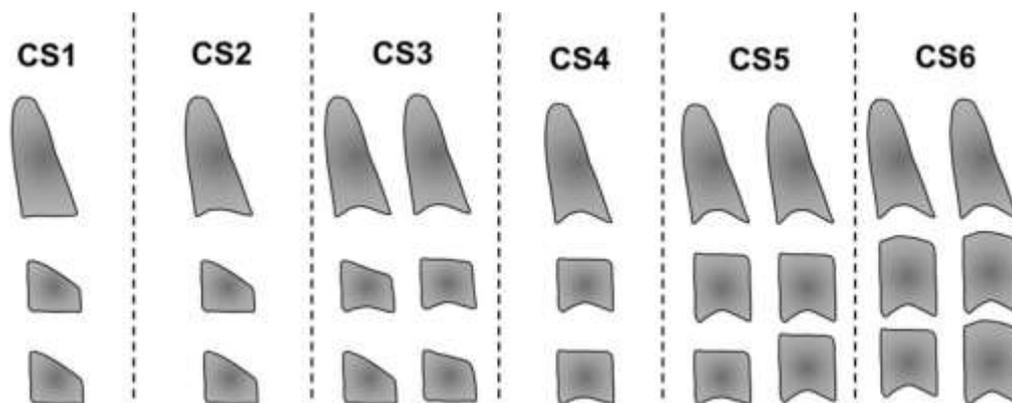
Os seis estágios são definidos da seguinte forma (Figura 2):

- CS1: As bordas inferiores das três vértebras são retas. Os corpos de C3 e C4 apresentam formato trapezoidal (a borda superior do corpo vertebral estreita-se da região posterior para a anterior). O pico de crescimento mandibular acontecerá, em média, dois anos após este estágio.
- CS2: A borda inferior de C2 apresenta uma concavidade. Os corpos de C3 e C4 são trapezoidais. O pico de crescimento mandibular acontecerá um ano após este estágio, aproximadamente.
- CS3: As bordas inferiores de C2 e C3 apresentam-se côncavas. Os corpos de C3 e C4 podem apresentar formato trapezoidal ou retangular. O pico de crescimento acontecerá durante o ano após este estágio.
- CS4: Há concavidades nas bordas inferiores de C2, C3 e C4. Os corpos de C3 e C4 apresentam forma de retângulo horizontal. O pico de crescimento mandibular ocorreu um ou dois anos antes deste estágio.
- CS5: As bordas inferiores côncavas de C2, C3 e C4 estão presentes. Os corpos de C3 ou

C4 apresentam formato quadrático. Se não quadrático, o corpo de outra vértebra cervical ainda se mantém na forma de retângulo horizontal. O pico de crescimento terminou um ano antes deste estágio, pelo menos.

- CS6: As concavidades nas bordas inferiores de C2, C3 e C4 ainda estão evidentes. Pelo menos um dos corpos de C3 ou C4 apresentam formato retangular vertical. Se não neste formato, o corpo da outra vértebra é quadrático. O pico de crescimento terminou há dois anos.

Figura 2 - Representação esquemática dos diferentes estágios de maturação óssea da maturação das vértebras cervicais.



Fonte: Baccetti e colaboradores.⁵

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.1 Cálculo amostral e erro de método

Um tamanho amostral de pelo menos 16 indivíduos para cada um dos três grupos, de acordo com a maturação esquelética (pré, pico e pós-pico) foi determinado para detectar um coeficiente de tamanho de efeito para os níveis da FAO de 1.0 entre qualquer um destes, com α em 0.01 e um poder de 0.8.¹¹⁰ Para a avaliação tanto dos estágios da MFM e MVC, o erro de método foi calculado através dos coeficientes *kappa* não ponderado e ponderado e os dados derivaram de uma amostra de 20 casos escolhidos aleatoriamente e expressos como média (intervalo de 95% de confiança).¹¹²⁻¹¹³

4.2 Análise dos dados

O *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 20.0 (SPSS® Inc., Chicago, Illinois, USA) foi usado para a análise estatística. Os testes para avaliar normalidade dos dados e equidade das variâncias foram os de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Após comprovada a normalidade da amostra, usou-se métodos paramétricos.

A significância das diferenças entre a distribuição dos sexos e idade cronológica entre os grupos de crescimento, de acordo com cada indicador do crescimento, foi testada por análise qui-quadrada e análise unidirecional de variância (do inglês, *one-way analysis of variance* ou ANOVA). O teste ANOVA foi usado também para avaliar a significância entre os diferentes níveis de FAO e a concentração entre os grupos de crescimento. Uma análise adicional foi feita através do agrupamento dos indivíduos em diferentes estágios de MFM e MVC, com teste qui-quadrado e ANOVA, avaliando a significância entre as diferenças nos parâmetros mencionados anteriormente. Um valor de $p < 0.05$ foi usado para rejeitar a hipótese nula.

5 RESULTADOS

Para a análise de concordância intra-observador de MS foi utilizado o coeficiente kappa de Cohen.¹¹¹ Quanto a avaliação das radiografias cefalométricas laterais, o kappa foi de 0,711, enquanto nas radiografias do terceiro dedo, o kappa encontrado foi de 0,897. Estes valores se traduzem em concordâncias intra-examinador substantiva e quase perfeita, respectivamente.

Para avaliação dos estágios MFM, os valores de kappa ponderado e não-ponderado foram respectivamente de 0,923 (0,818-1) e 0,868 (0,697-1). Para os estágios de MVC, os valores de kappa ponderado e não-ponderados foram de 0,864 (0,750-0,997) e 0,693 (0,469-0,917), respectivamente.^{112,114}

A distribuição dos sexos e idades nos estágios de crescimento, de acordo tanto com o MFM e MVC, estão apresentados na tabela 1. Enquanto a distribuição dos sexos se mostrou similar entre os grupos comparados, a idade cronológica mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre os três grupos ($p < 0.001$). Não foi encontrada diferença entre a distribuição dos sexos entre os indivíduos, quando agrupados em diferentes estágios de MFM e MVC.

Os níveis de FAO (em densidade óptica) e a concentração encontrada entre os grupos estão relatadas na Tabela 2. A densidade óptica dos níveis de FAO, expressa em AU*E3, variaram de 66.7 ± 25.7 a 87.5 ± 37.7 (grupos pós-puberal e puberal, respectivamente) para o método de MFM e de 74.1 ± 32.1 a 80.6 ± 29.7 (grupos pós-puberal e pré-puberal, respectivamente) para o método de MVC. A concentração de FAO (em ng/l) variou de 498.6 ± 8.8 a 506.3 ± 13.7 (grupos pós-puberal e puberal, respectivamente) para o método de MFM e de 501.3 ± 11.4 a 503.6 ± 11.9 (grupos pós-puberal e puberal, respectivamente) para o método MVC. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, independentemente do indicador de crescimento ($p > 0.77$, pelo menos).

Os níveis de FAO e a concentração, de acordo com os métodos MFM e MVC estão apresentados na tabela 3. Valores semelhantes, sem diferença significativa, foram observados para os níveis de FAO e concentração usando os estágios de MFM. Não foi encontrada diferença também quando os indivíduos foram agrupados nos diferentes grupos determinados pelo método MVC, apesar de uma discreta tendência de escores reduzidos no estágio 6.

Tabela 1 - Distribuição demográfica para cada grupo de crescimento puberal de acordo com os indicadores de crescimento

Indicador do crescimento	Variáveis	Grupos			ρ
		Pré-puberal	Puberal	Pós-puberal	
Método MFM	Sexo (F/M)	7/9	6/15	16/12	0.137;
	Idade (anos)	10.4 ±1.9	13.3 ±1.8	15.4 ±1.3	0.000;
Método MVC	Sexo (F/M)	12/14	9/13	8/9	0.910;
	Idade (anos)	10.4 ±1.9	13.4 ±1.7	15.2 ±1.4	0.000;

Legenda: A idade é apresentada como média ± desvio padrão. F (sexo feminino), M (sexo masculino); Sig (significância da diferença); NS (não-significante) e S (significante)

Fonte: A autora, 2019

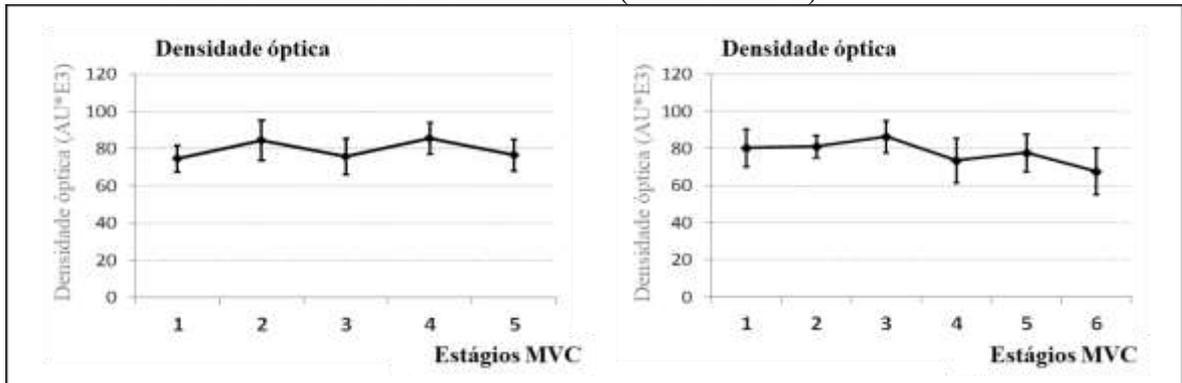
Tabela 2 - Níveis de FAO (em densidade óptica – AU*E3) e concentração para cada um dos grupos

Indicador de crescimento	Variáveis	Grupos			ρ
		Pré-puberal	Puberal	Pós-puberal	
Método MFM	N	16	21	28	
	Níveis da FAO (AU*E3)	77.4 ±25.3	87.5 ±37.7	66.7 ±25.7	0.822;
	Concentração da FAO (ng/l)	502.3 ±8.9	506.3 ±13.7	498.6 ±8.8	0.811;
Método MVC	N	26	22	17	
	Níveis da FAO (AU*E3)	80.6 ±29.7	80.4 ±33.6	74.1 ±32.1	0.772;
	Concentração da FAO (ng/l)	503.5 ±10.9	503.6 ±11.9	501.3 ±11.4	0.783;

Legenda: Dados da FAO estão apresentados como dados ± desvio padrão. N (número de pacientes); ρ (significância da diferença); NS (não-significante) e S (significante)

Fonte: A autora, 2019

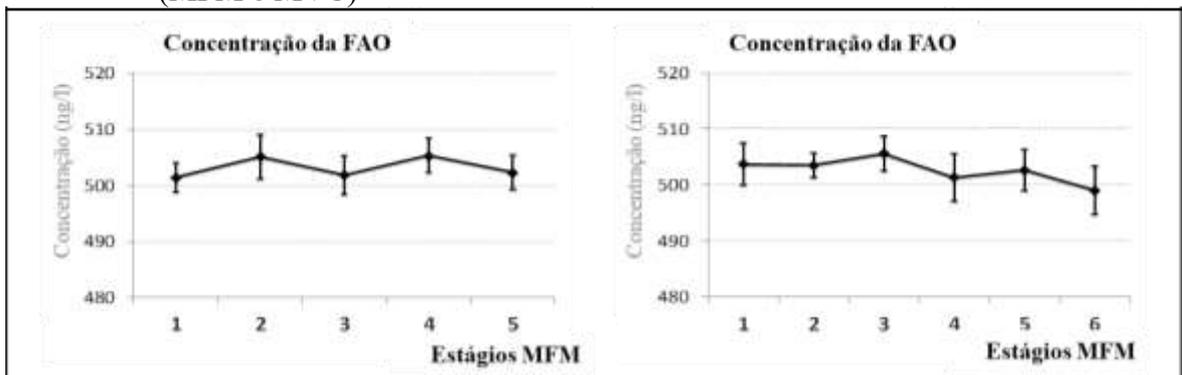
Tabela 3 - Densidade óptica (obtida a partir da leitura no espectrofotômetro) de acordo com os indicadores do crescimento (MFM e MVC)



Legenda: Dados estão apresentados como média \pm erro padrão. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entres os estágios MFM e MVC.

Fonte: A autora, 2019.

Tabela 4 - Concentração da FAO salivar de acordo com os indicadores de crescimento (MFM e MVC)



Legenda: Dados estão apresentados como média \pm erro padrão. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entres os estágios MFM e MVC.

Fonte: A autora, 2019.

6 DISCUSSÃO

Dentre os métodos de análise de crescimento, há destaque para as análises radiográficas, pela sua facilidade de obtenção, e por serem métodos consagrados na especialidade, ainda que exijam que os paciente se submetam a radiação.

Apesar do uso disseminado das radiografias para detecção da fase de crescimento, a comparação de diferentes técnicas radiográficas entre si ou mesmo com diferentes indicadores de crescimento, trazem resultados heterogêneos da confiabilidade destes exames.

Na metodologia deste trabalho, foram avaliados três métodos de detecção da fase de crescimento: radiografias cefalométrica lateral e do terceiro dedo da mão, além dos níveis dos da fosfatase alcalina óssea, um biomarcador do metabolismo ósseo, obtida na saliva.

As radiografias cefalométricas laterais permitem o acompanhamento longitudinal do crescimento mandibular, através de medidas angulares e lineares. Entretanto, a comparação dos incrementos de crescimento ósseo é feita em radiografias seriadas, ou seja, há a necessidade de se comparar medidas cefalométricas em diversos exames, para determinar o surto puberal.³⁶⁻³⁹

Em contrapartida, a avaliação da maturação das vértebras cervicais oferece a possibilidade de detectar em apenas um exame se o paciente se encontra no surto puberal. Isto é possível pela existência de um padrão de maturação, construído através de observações longitudinais de diversos autores.^{5,44-46,115}

No presente trabalho, a decisão pelo uso desta técnica foi motivada por este ser um exame de uso cotidiano na clínica ortodôntica. Além de tal fato, a classificação da maturação apresenta relativa simplicidade e confiabilidade, ainda que haja alguma controvérsia em relação a sua reprodutibilidade.^{49,51,117-121}

Uma forma de contornar a questão da reprodutibilidade da avaliação da MVC é o treinamento do profissional com a técnica.¹¹⁶ Neste estudo, dois avaliadores (MS e GP) foram responsáveis pela avaliação visual das radiografias laterais dos pacientes, sendo um destes um avaliador experiente (GP), que conferiu os resultados da primeira avaliadora.

No teste de concordância intra-examinador, a avaliadora MS analisou 13 radiografias de cada tipo, selecionadas de forma aleatória. A avaliação dos mesmos exames foi repetida após 15 dias, sendo possível encontrar valores de kappa de 0,711 para o método MVC e 0,897 no método MFM. Estes valores se assemelham a alguns dos estudos prévios que avaliaram tais métodos.^{10,48,50,60,109,121}

A concordância das classificações de MVC feitas por ambos os avaliadores, através dos

coeficientes kappa ponderado e não-ponderado, foi de 0,864 (0,750-0,997) e 0,693 (0,469-0,917), respectivamente. Esses valores foram considerados quase perfeito para o ponderado e substancial para o não-ponderado, de acordo com a definição de Cohen.¹¹⁰ Estes resultados são semelhantes aos encontrados em outros estudos, o que corrobora a reprodutibilidade do método de avaliação visual.^{47,116,122}

Entretanto, outros estudos encontraram baixa reprodutibilidade inter-observador.^{49,117,120} No trabalho de Gabriel e col, os autores apontaram uma reprodutibilidade baixa entre os avaliadores, o que não indicaria o método de MVC como única técnica de avaliação das fases de crescimento.⁴⁹ Contudo, esta conclusão pode ser questionada, uma vez que os valores de kappa encontrados podem ser considerados moderados pelos valores estabelecidos por Kendall.¹²³ Já o trabalho de Nestman usou a mesma amostra e avaliadores do trabalho de Gabriel, com o intuito de realizar uma análise mais detalhada.^{49,120} Neste estudo, concluiu-se que apenas a avaliação visual das vértebras não seria satisfatória para determinar a fase de crescimento, pois em parte da amostra não foi possível determinar o estágio de MVC. Uma justificativa para a dificuldade de se estabelecer os estágios a partir dos questionários pode ser o fato de que a transição de uma fase de maturação para a outra não ocorre imediatamente. Portanto, haveria fases de transição, nas quais a classificação pode ser mais difícil, assim como a concordância entre avaliadores mais inconsistente.

Corroborando os achados de Nestman, o trabalho de Zhao e colaboradores propôs complementar a avaliação da fase de crescimento com as radiografias periapicais do terceiro dedo e os níveis da fosfatase óssea na saliva.⁵⁰

O método de avaliação através da maturação da falange média é um desmembramento da radiografia de mão e punho, com a vantagem de apresentar dose de radiação reduzida e facilidade de obtenção do exame. Isto é possível pelo uso de radiografias número 2 (usadas para tomadas periapicais), processadas de modo convencional, e aparelho de radiografia dental, comumente presente em consultórios e clínicas odontológicas.⁹ Além disto, o guia de solicitação e uso das radiografias odontológicas publicada no ano de 2016 pela Sociedade Britânica de Ortodontia não aconselha a solicitação das radiografias de mão e punho para a detecção da fase de crescimento, por ser um exame adicional na documentação ortodôntica de pacientes jovens. A justificativa é que tal detecção poderia ser feita através das radiografias cefalométricas laterais, ainda que a técnica de MVC apresente suas limitações.⁸

Neste estudo, a obtenção das radiografias foi feita de acordo com a descrição de pesquisas anteriores, estando o paciente sentado, com o dedo médio da mão direita posicionado ao centro do filme radiográfico.^{10,124}

A literatura relacionada à confiabilidade da MFM em relação a outros métodos avaliação do crescimento é pouco extensa. A maioria dos estudos compara a MFM do terceiro dedo apenas com os estágios de crescimento encontrados na análise de MVC, apresentando boa correlação entre as fases estabelecidas por ambos os exames.^{10,11,121,125-127}

Ao se avaliar a concordância inter-observadores para o método MFM, os coeficientes kappa ponderado e não ponderado encontrados neste estudo, apresentaram valores de 0,923 (0,818-1) e 0,868 (0,697-1), respectivamente. Tais valores indicam excelente concordância na avaliação, corroborando os estudos publicados anteriormente.^{11,117-118}

Segundo o princípio ALARA (sigla do inglês, *As Low As Reasonable Achievable*), a dose de radiação oferecida em um exame radiográfico deve ser a menor possível para se obter uma imagem que auxilie no diagnóstico de uma condição específica.¹²⁸ Entretanto, especialmente em pacientes crianças e jovens, comumente há a necessidade de se repetir o exame radiográfico, por estes terem se movimentado na hora da tomada. Um fator agravante da repetição é que nestes pacientes, a sensibilidade ao câncer induzido por radiação é aproximadamente dez vezes maior quando comparados a adultos de meia-idade, e até três vezes maior que a sensibilidade da população no geral.¹²⁹ Ainda deve-se levar em consideração que estes pacientes possivelmente podem ser submetidos a outras radiografias na vida adulta, aumentando a dose de radiação acumulada ao longo da vida.

A busca pela redução das exposições radiográficas na avaliação do crescimento gerou um maior interesse em métodos não-radiográficos para esse fim. A Medicina utiliza diferentes técnicas com tal intuito, como medições de maturação sexual, padrões de velocidade de crescimento e peso, além de biomarcadores do crescimento ósseo explorados, principalmente, no sêrum sanguíneo.^{52,75,81,130,131}

A Odontologia usa a quantificação destes marcadores para avaliar o remodelamento ósseo localizado, com destaque para a Periodontia, que trabalha com as enzimas relacionadas às doenças dos tecidos periodontais. A Ortodontia faz uso destes marcadores, principalmente, para avaliar o remodelamento induzido pela movimentação ortodôntica. Todavia, apenas em 2015 surgiu o primeiro trabalho avaliando sua correlação com o crescimento ósseo em pacientes jovens.¹³ A Ortodontia, entretanto, não se ateu às mensurações feitas no sêrum sanguíneo, havendo proposições de se quantificar tais enzimas também no fluido gengival e saliva.^{11,75,132}

A saliva apresenta como principais vantagens a facilidade de coleta das amostras e menor custo de material. Além disto, a simplicidade técnica em possibilitar a coleta em consultórios e clínicas privadas parece uma possibilidade promissora para a avaliação do crescimento. Por

este fato, o presente estudo decidiu investigar os níveis de um biomarcador do crescimento ósseo neste fluido oral.

Os primeiros estudos na área da Ortodontia foram feitos com análise do fluido gengival, para determinar a atividade enzimática da fosfatase alcalina.^{4,90} A escolha desta enzima pode ser justificada por esta estar relacionada à mineralização óssea e, em estudos prévios, seus níveis terem apresentado variação de acordo com as fases do crescimento, com maiores concentrações desta enzima encontradas na fase correspondente ao surto de crescimento puberal.^{81,83,84,131}

Os critérios de inclusão dos pacientes nestes estudos foram os mesmos adotados pelo presente trabalho.^{4,90} A exclusão dos pacientes que fizeram uso de antibióticos previamente a coleta foi pelo fato de o metabolismo destes medicamentos alterar os níveis da fosfatase alcalina.^{133,134} Os pacientes foram avaliados também quanto a condição periodontal, visto que a presença de inflamação gengival ou mesmo presença de doença periodontal alteram os valores de tal enzima.^{104,135}

Apesar dos mesmos critérios de inclusão e metodologia semelhante, o presente trabalho alterou alguns pontos da metodologia. Por exemplo, a saliva foi usada, no lugar do FGC, para mensurar os níveis da enzima, com intuito de simplificar a fase de coleta da amostra. A coleta de fluido gengival exige treinamento e material específicos, necessitando do Periopaper®, uma fita absorvente, assim como controle crítico da exsudação de sangue pelo sulco.¹³⁶

Outra divergência entre os trabalhos foi que este estudo avaliou os níveis da fosfatase alcalina óssea e não a atividade enzimática. A diferença entre ambos é que a quantificação da atividade enzimática não é específica para a isoforma óssea da enzima, o que pode gerar um fator de confusão quanto ao que realmente está se mensurando. Entretanto, o uso da atividade enzimática pode ser baseado na premissa que, em pacientes jovens saudáveis, os níveis da fosfatase alcalina óssea é maior que os de suas outras isoformas.²³

A quantificação da isoforma óssea é possível através do teste de imunoabsorção enzimática ou ELISA, passível de ser feito tanto em sêrum sanguíneo quanto em saliva.^{14,83,131,132} Neste, a enzima torna-se o antígeno, que se liga ao anticorpo específico para esta isoforma. Após a ligação antígeno-anticorpo, as amostras são avaliadas através da espectrofotometria para gerar os resultados de densidade óptica, que posteriormente serão convertidos em valores de concentração enzimática.

Assim como no presente estudo, as pesquisas que utilizaram FGC, avaliaram se há diferença entre a atividade da fosfatase alcalina em diferentes estágios de maturação, determinadas através do método de MVC. Os pacientes foram divididos em três estágios: pré-

surto, surto e pós-surto de crescimento puberal. Entretanto, os resultados foram divergentes. Os estudos de Perinetti e colaboradores encontraram níveis aumentados da atividade enzimática na fase de surto de crescimento, quando comparados as fases pré e pós-surto.^{4,90} O presente trabalho não encontrou diferença estatisticamente significativa entre os níveis da fosfatase alcalina óssea quando comparados os estágios de crescimento, determinados pelos métodos MFM e MVC.

Uma possível justificativa para esta diferença de resultados entre os estudos supracitados seria que o fluido gengival pode ser uma fonte de biomarcadores que detecte melhor o metabolismo ósseo local, por isso a expressão enzimática seria maior neste fluido oral. Outra justificativa poderia ser a dificuldade de difusão da enzima, oriunda do sangue ou mesmo dos ossos, para a saliva.¹³⁷ Contudo, não há relato na literatura de como é a passagem desta enzima especificamente.

Além disso, a saliva ainda pode sofrer o chamado “efeito da matriz”, onde há interferência de outros fatores na expressão da enzima.¹³⁸ Uma destas interferências poderia vir da alteração do pH da saliva, provocada pelo estímulo salivar. Como no presente estudo, o fluxo salivar não foi estimulado e os pacientes não fizeram uso de medicamentos/drogas ilícitas ou apresentavam qualquer doença no momento da coleta, a possibilidade de interferência do pH foi descartada. Não há na literatura, porém, estudos que avaliem os efeitos da matriz nas concentrações da fosfatase alcalina na saliva.

Outro fator que poderia alterar os valores de concentração salivar seria a degradação enzimática durante a coleta e o armazenamento. Todavia, o presente estudo fez a coleta do fluido salivar em recipiente com gelo, seguindo as normas de processamento e armazenamento sugeridas pelo *kit* de análise.¹⁰⁶

Considerando os estudos que mensuraram os níveis da fosfatase alcalina óssea e a atividade enzimática, correlacionando-os a outros indicadores de crescimento, os resultados foram divergentes e semelhante ao presente estudo. Tarvade e colaboradores foram os primeiros a avaliar a correlação da atividade da FAL na saliva com um indicador radiográfico do crescimento, através do método de MFM. Neste trabalho, foi encontrado um expressivo aumento da atividade da enzima em relação no estágio referido como o de pico de crescimento puberal.¹³

O trabalho de Wijaya comparou a quantidade de proteínas e os níveis de FAO na saliva em relação aos estágios de maturação vertebral.¹⁴ Os critérios de inclusão e metodologia de análise das amostras foram semelhantes ao do presente estudo, exceto pelo *kit* de análise utilizado. No estudo referido, foi usado um *kit* não-específico para FAO, que declara não ter

reatividade cruzada com outras isoformas. Assim como o presente estudo, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa da correlação dos estágios de maturação com os níveis salivares da FAO.

No estudo de Alhazmi foi avaliada a capacidade da atividade enzimática, concentração proteica e idade cronológica na predição da fase do crescimento determinada pelo método de MVC.¹² Como resultado, encontrou-se o pico da atividade enzimática na fase pré-puberal. A concentração proteica foi mais expressiva nos estágios CVMS 3 e 5, que correspondem respectivamente ao pico e final de crescimento puberal. Considerando os fatores avaliados, a combinação da idade cronológica com a concentração mostrou a melhor capacidade em prever o estágio de maturação vertebral dos pacientes.

Se considerado que houve apenas diferença significativa da atividade enzimática em dois estágios maturacionais, este resultado contrasta em parte com o do presente estudo. Entretanto, a comparação das metodologias traz diferenças entre os trabalhos que podem justificar alguns dos resultados divergentes.

O estudo de Alhazmi usou radiografias feitas até seis meses antes da coleta salivar, um intervalo de tempo maior que o usado neste estudo, que foi de dois meses.¹² Tal intervalo pode ter ou não alterado a fase de maturação ou levado a um estágio transicional entre as fases, que não seria compatível com o exame usado na avaliação. Outro fator não mencionado no artigo, mas que poderia ser um fator de confusão, é que alguns pacientes da amostra já haviam iniciado o tratamento ortodôntico, que altera os níveis da FAL, para menos ou mais durante a movimentação ortodôntica.^{98,139}

O presente estudo captou 65 pacientes em busca de tratamento ortodôntico na Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, com o intuito de quantificar os níveis da FAO na saliva e comparar se há diferença nestes níveis entre os estágios de maturação do crescimento, avaliados em dois tipos de radiografia. Os dois métodos radiográficos utilizados foram os de avaliação da MVC e da MFM, com uma técnica menos difundida, porém, acessível ao alcance do clínico, pela facilidade de obtenção do exame e de interpretação das imagens. Além destes, o trabalho propôs o uso de um método enzimático: a medição de um biomarcador do metabolismo ósseo, a fosfatase alcalina, aqui avaliada em sua isoforma óssea.

A proposta de se avaliar os níveis da fosfatase alcalina óssea veio da possibilidade de, caso esta mostrasse uma variação, comparável aos exames radiográficos, poderia ser um método de avaliação não-invasivo, de coleta simples e barata. Entretanto, não foi detectada diferença estatística significativa entre os diferentes estágios de maturação óssea, determinados pelas

radiografias cefalométrica lateral e do terceiro dedo. Este resultado é comparável ao estudo de Wijaya e parcialmente ao estudo de Alhazmi, mesmo com diferenças metodológicas entre os trabalhos.^{12,14}

A partir destas comparações, pode-se inferir que os níveis da fosfatase alcalina óssea na saliva não diferem com os estágios maturacionais. A quantificação dos níveis desta enzima ou mesmo sua atividade parece não ser confiável na saliva, diferentemente do que acontece no sangue ou no fluido gengival. Mais estudos devem ser realizados nesta área, com o intuito de verificar os resultados obtidos, ou mesmo avaliar os níveis de outra enzima do metabolismo ósseos, como a osteocalcina.

Como limitações do estudo, tem-se a necessidade de excluir da amostra os pacientes que fazem uso constante de medicação ou mesmo o fizeram em um período próximo a coleta. Estes pacientes foram orientados a não ingerir medicamentos no período entre a avaliação periodontal e a coleta.

Outra limitação foi o uso da saliva como fonte de detecção da FAO, e não o sangue ou FGC. A saliva apresenta o pouco explorado na literatura “efeito da matriz”, onde outras substâncias nele presentes interferem na expressão enzimática. Tal efeito pode reduzir os níveis detectáveis da enzima ou de fato este fluido pode não apresentar concentrações variáveis da FAO em paciente saudáveis, sendo diferenças observadas apenas em pacientes com quadro de doença periodontal. Todavia, a coleta sanguínea, apesar de método mais acurado para esta avaliação enzimática, é uma técnica mais invasiva, com questão ética considerável e com menor adesão por parte dos pacientes e responsáveis.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

Não há diferença significativa entre os níveis da fosfatase alcalina óssea mensurada na saliva em relação aos estágios de crescimento determinados pelos métodos MVC e MFM;

Portanto, os níveis da fosfatase alcalina óssea na saliva não são correlacionáveis aos estágios maturacionais, não sendo capaz de diferenciá-los e ser usada como indicador confiável das fases de crescimento ósseo. Neste cenário, o uso das radiografias cefalométrica lateral e do terceiro dedo não aparecem como dispensáveis na detecção da fase de crescimento. Estas radiografias apresentam as vantagens de serem exames já solicitados na documentação ortodôntica (radiografia cefalométrica lateral) e de fácil obtenção para o clínico (radiografia do terceiro dedo), permitindo um acompanhamento longitudinal do crescimento, com menor dose de radiação. Além disso, as técnicas de avaliação radiográficas mostraram-se reprodutíveis, o que facilita a classificação dos exames por ortodontistas.

REFERÊNCIAS

1. Baccetti T, Franchi L, Stahl F. Comparison of 2 comprehensive Class II treatment protocols including the bonded Herbst and headgear appliances: A double-blind study of consecutively treated patients at puberty. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2009;135(6):698.e1-698.e10. DOI: 10.1016/j.ajodo.2008.03.015.
2. Franchi L, Alvetro L, Giuntini V, Masucci C, Defraia E, Baccetti T. Effectiveness of comprehensive fixed appliance treatment used with the Forsus Fatigue Resistant Device in Class II patients. *Angle Orthod.* 2011;81(4):678–83. DOI: 10.2319/102710-629.1.
3. Cha JY, Kennedy DB, Turley PK, et al. Outcomes of early versus late treatment of severe Class II high-angle patients. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2019;156(3):375–82. DOI: 10.1016/j.ajodo.2018.10.019.
4. Perinetti G, Franchi L, Castaldo A, Contardo L. Gingival crevicular fluid protein content and alkaline phosphatase activity in relation to pubertal growth phase. *Angle Orthod.* 2012;82(6):1047–52. DOI: 10.2319/123111-806.1.
5. Baccetti T, Franchi L, McNamara JA. The Cervical Vertebral Maturation (CVM) method for the assessment of optimal treatment timing in dentofacial orthopedics. *Semin. Orthod.* 2005;11(3):119–29. DOI:10.1053/j.sodo.2005.04.005.
6. Greulich W PI. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. 2nd ed. Stanford, California: Stanford University Press; 1959.
7. Fishman LS. Radiographic evaluation of skeletal maturation. *Angle Orthod.*1982; 52(2):88–112. DOI: 10.1043/0003-3219(1982)052<0088:REOSM>2.0.CO;2.
8. Isaacson KG, Thom AR, Atack NE, Horner K, Whaites E. Other views. In: *Orthodontic radiographs: Guidelines for the use of radiographs in clinical orthodontics* British Orthodontic Society; 2016:16. Available from: [http://www.bos.org.uk/Portals/0/Public/docs/General_Guidance/Orthodontic Radiographs 2016 - 2.pdf](http://www.bos.org.uk/Portals/0/Public/docs/General_Guidance/Orthodontic_Radiographs_2016_-_2.pdf).
9. Abdel-Kader HM. The reliability of dental x-ray film in assessment of MP3 stages of the pubertal growth spurt. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 1998;114(4):427–9. DOI: 10.1016/s0889-5406(98)70188-x.
10. Perinetti G, Perillo L, Franchi L, Di Lenarda R, Contardo L. Maturation of the middle phalanx of the third finger and cervical vertebrae: A comparative and diagnostic agreement study. *Orthod. Craniofacial Res.* 2014;17(4):270–9. DOI: 10.1111/ocr.12052.
11. Gupta S, Jain S, Gupta P, Deoskar A. Determining skeletal maturation using insulin-like growth factor I (IGF-I) test. *Prog. Orthod.* 2012;13(3):288–95. DOI: 10.1016/j.pio.2011.09.006.
12. Alhazmi N, Trotman CA, Finkelman M, Hawley D, Zoukhri D, Papathanasiou E. Salivary alkaline phosphatase activity and chronological age as indicators for skeletal maturity. *Angle Orthod.* 2019;89(4):637–42. DOI: 10.2319/030918-197.1.
13. Tarvade SM, Ramkrishna S, Sarode S. Salivary alkaline phosphatase-a biochemical marker for growth prediction. *Indian J. Basic Appl. Med. Res.* 2015;4(June):17–22.
14. Wijaya H, Kusdhany LS, Redjeki S, Soegiharto BM. The salivary bone-specific alkaline phosphatase in relation to pubertal growth phase in Indonesian children. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2017;10(5):389–92. DOI:10.22159/ajpcr.2017.v10i5.17752.
15. Seibel MJ, Meier C. Biochemical Markers of Bone Turnover – Basic Biochemistry and Variability. *Osteoporosis* 2010;26(November):97–130. DOI: 10.1007/978-1-59745-459-9_5.
16. Shaw N, Högl W. Biochemical Markers of Bone Metabolism. *Pediatr. Bone*

- 2012;30(8):361–81. DOI:10.1016/B978-0-12-382040-2.10015-2.
17. Paschalis EP, Recker R, Dicarlo E, Doty SB, Atti E, Boskey A. Distribution of Collagen Cross-Links in Normal Human Trabecular Bone. *J. Bone Miner. Res.* 2003;18(11):1942–6. DOI:10.1359/jbmr.2003.18.11.1942.
 18. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos. Int.* 2006;17(3):319–36. DOI:10.1007/s00198-005-2035-9.
 19. Szulc P, Seeman E, Delmas PD. Biochemical measurements of bone turnover in children and adolescents. *Osteoporos. Int.* 2000;11(4):281–94. DOI: 10.1007/s001980070116.
 20. Rogers A, Eastell R, Hannon RA. Biochemical markers of bone turnover. In: Lobo RA, ed. *Treatment of postmenopausal woman basic and clinical aspects.* ed 3. St. Louis: Elsevier Academic Press; 2007:337–50.
 21. Masters PW, Jones RG, Purves DA, Cooper EH, Cooney JM. Commercial Assays for Serum Osteocalcin Give Clinically Discordant Results. *Clin. Chem.* 1994;40(3):358–63. DOI: 10.1093/clinchem/40.3.358.
 22. Adrien Nizeta, Etienne Cavaliera, Peter Stenvinkelb M, Haarhausb, c, d PM. Bone alkaline phosphatase: an important biomarker in chronic kidney disease–mineral and bone disorder. *Clin. Chim. Acta* 2019. DOI: 10.1016/j.cca.2019.11.012.
 23. Schiele F, Henny J, Hitz J, Petitcherc C, Gueguen R, Siest G. Total bone and liver alkaline phosphatases in plasma: Biological variations and reference limits. *Clin. Chem.* 1983;29(4):634–41. DOI: 10.1093/clinchem/29.4.634.
 24. Moyers RE. *Ortodontia* - Robert E. Moyers. In: *Ortodontia* 4th ed.; 1991:7–17.
 25. Moore SA. A brief review of the development and growth of the human jaws and teeth. *Int. J. Orthod. Oral Surg. Radiogr.* 1931;17(11):1057–65. DOI: 10.1016/S0099-6963(31)80110-3.
 26. Laowansiri U, Behrents RG, Araujo E, Oliver DR, Buschang PH. Maxillary growth and maturation during infancy and early childhood. *Angle Orthod.* 2013;83(4):563–71. DOI: 10.2319/071312-580.1.
 27. Liu YP, Behrents RG, Buschang PH. Mandibular growth, remodeling, and maturation during infancy and early childhood. *Angle Orthod.* 2010;80(1):97–105. DOI: 10.2319/020309-67.1.
 28. Yoon SS, Chung CH. Comparison of craniofacial growth of untreated Class i and Class II girls from ages 9 to 18 years: A longitudinal study. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2015;147(2):190–6. DOI: 10.1016/j.ajodo.2014.10.023.
 29. Stahl F, Baccetti T, Franchi L, McNamara JA. Longitudinal growth changes in untreated subjects with Class II Division 1 malocclusion. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2008;134(1):125–37. DOI: 10.1016/j.ajodo.2006.06.028.
 30. Wolfe SM, Araujo E, Behrents RG, Buschang PH. Craniofacial growth of Class III subjects six to sixteen years of age. *Angle Orthod.* 2011;81(2):211–6. DOI: 10.2319/051010-252.1.
 31. Tollaro I, Baccetti T, Bassarelli V, Franchi L. Class III malocclusion in the deciduous dentition: A morphological and correlation study. *Eur. J. Orthod.* 1994;16(5):401–8. DOI: 10.1093/ejo/16.5.401.
 32. Battagel JM. The aetiological factors in Class III malocclusion. *Eur. J. Orthod.* 1993;15(5):347–70. DOI: 10.1093/ejo/15.5.347.
 33. Jacobson A, Evans WG, Preston CB, Sadowsky PL. Mandibular prognathism. *Am. J. Orthod.* 1974;66(2):140–71. DOI: 10.1016/0002-9416(74)90233-4.
 34. Guyer EC, Ellis EE, McNamara JA, Behrents RG. Components of class III malocclusion in juveniles and adolescents. *Angle Orthod.* 1986;56(1):7–30. DOI: 10.1043/0003-3219(1986)056<0007:COCIMI>2.0.CO;2.
 35. Zionix Alexander AE, McNamara JA, Franchi L, Baccetti T. Semilongitudinal

- cephalometric study of craniofacial growth in untreated Class III malocclusion. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2009;135(6):700.e1-700.e14. DOI: 10.1016/j.ajodo.2008.06.025.
36. Engel TP, Renkema AM, Katsaros C, Pazera P, Pandis N, Fudalej PS. The cervical vertebrae maturation (CVM) method cannot predict craniofacial growth in girls with Class II malocclusion. *Eur. J. Orthod.* 2016;38(1):1–7. DOI: 10.1093/ejo/cju085.
 37. Buschang PH, Tanguay R, Lapalme L, Demirjian A. Mandibular growth prediction: Mean growth increments versus mathematical models. *Eur. J. Orthod.* 1990;12(3):290–6. DOI: 10.1093/ejo/12.3.290.
 38. Mito T, Sato K, Mitani H. Predicting mandibular growth potential with cervical vertebral bone age. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2003;124(2):173–7. DOI: 10.1016/s0889-5406(03)00401-3.
 39. Limab ASG and EM. Mandibular growth during adolescence. *Angle Orthod.* 2006;76(5):786–90. DOI: 10.1043/0003-3219(2006)076[0786:MGDA]2.0.CO;2.
 40. Lamparski DG NS. Skeletal age assessment utilizing cervical vertebrae. In: *Treatment timing: Orthodontics in four dimensions.* Ann Arbor, Michigan; 2002.
 41. Todd TW, Pyle SI. A quantitative study of the vertebral column by direct and roentgenoscopic methods. *Am. J. Phys. Anthropol.* 1928;12(2):321–38. DOI: <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330120211>.
 42. Farman AG, Nortjé CJ, Joubert JJ. Radiographic profile of the first cervical vertebra. *J. Anat.* 1979;128(Pt 3):595–600. PMID: 468710 PMCID: PMC1232910.
 43. Farman AG, Escobar V. Radiographic appearance of the cervical vertebrae in normal and abnormal development. *Br. J. Oral Surg.* 1982;20(4):264–74. DOI: 10.1016/s0007-117x(82)80022-x.
 44. Hassel B, Farman AG. Skeletal maturation evaluation using cervical vertebrae. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 1995;107(1):58–66. DOI: 10.1016/s0889-5406(95)70157-5
 45. Franchi L, Baccetti T, McNamara JA. Mandibular growth as related to cervical vertebral maturation and body height. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2000;118(3):335–40. DOI: 10.1067/mod.2000.107009.
 46. Baccetti T, Franchi L, McNamara Junior JA. An Improved Version of the Cervical Vertebral Maturation (CVM) Method for the Assessment of Mandibular Growth. *Angle Orthod.* 2002;72(4):316–23. DOI: 10.1043/0003-3219(2002)072<0316:AIVOTC>2.0.CO;2.
 47. Rainey BJ, Burnside G, Harrison JE. Reliability of cervical vertebral maturation staging. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2016;150(1):98–104. DOI: 10.1016/j.ajodo.2015.12.013.
 48. Rongo R, Valleta R, Bucci R, Bonetti GA, Michelotti A, D'Antò V. Does clinical experience affect the reproducibility of cervical vertebrae maturation method? *Angle Orthod.* 2015;85(5):841–7. DOI: 10.2319/080414-544.1.
 49. Gabriel DB, Southard KA, Qian F, Marshall SD, Franciscus RG, Southard TE. Cervical vertebrae maturation method: Poor reproducibility. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2009;136(4):478e1-7. DOI: 10.1016/j.ajodo.2007.08.028.
 50. Zhao XG, Lin J, Jiang JH, Wang Q, Hong SNG. Validity and reliability of a method for assessment of cervical vertebral maturation. *Angle Orthod.* 2012;82(2):229–34. DOI: 10.2319/051511-333.1.
 51. Morris KM, Fields HW, Beck FM, Kim DG. Diagnostic testing of cervical vertebral maturation staging: An independent assessment. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2019;156(5):626–32. DOI: 10.1016/j.ajodo.2018.11.016.
 52. Tanner JM, Whitehouse RH. Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity, weight velocity, and stages of puberty. *Arch. Dis. Child.* 1976;51(3):170–9.

- DOI: 10.1136/adc.51.3.170.
53. Martins R, Sakima T. Considerações sobre a previsão do surto de crescimento puberal. *Ortodontia*. 1977;10(3):163–70.
 54. Verma D, Peltomäki T, Jäger A. Reliability of growth prediction with hand-wrist radiographs. *Eur. J. Orthod.* 2009;31(4):438–42. DOI: 10.1093/ejo/cjp015.
 55. Flores-Mir C, Burgess CA, Champney M, Jensen RJ, Pitcher MR, Major PW. Correlation of skeletal maturation stages determined by cervical vertebrae and hand-wrist evaluations. *Angle Orthod.* 2006;76(1):1–5. DOI: 10.1043/0003-3219(2006)076[0001:COSMSD]2.0.CO;2.
 56. Gandini P, Mancini M, Andreani F. A comparison of hand-wrist bone and cervical vertebral analyses in measuring skeletal maturation. *Angle Orthod.* 2006;76(6):984–9. DOI: 10.2319/070605-217.
 57. Beit P, Peltomäki T, Schätzle M, Signorelli L, Patcas R. Evaluating the agreement of skeletal age assessment based on hand-wrist and cervical vertebrae radiography. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2013;144(6):838–47. DOI: 10.1016/j.ajodo.2013.07.015.
 58. Houston WJ. Relationships between skeletal maturity estimated from hand-wrist radiographs and the timing of the adolescent growth spurt. *Eur. J. Orthod.* 1980;2(2):81–93. DOI: 10.1093/ejo/2.2.81.
 59. Hägg U, Taranger J. Skeletal stages of the hand and wrist as indicators of the pubertal growth spurt. *Acta Odontol. Scand.* 1980;38(3):187–200. DOI: 10.3109/00016358009004719.
 60. Perinetti G, Sbardella V, Contardo L. Diagnostic reliability of the third finger middle phalanx maturation (MPM) method in the identification of the mandibular growth peak. *Eur. J. Orthod.* 2017;39(2):194–201. DOI: 10.1093/ejo/cjw059.
 61. Hägg U, Taranger J. Maturation indicators and the pubertal growth spurt. *Am. J. Orthod.* 1982;82(4):299–309. DOI: 10.1016/0002-9416(82)90464-X.
 62. Rajagopal R, Kansal S. A comparison of modified MP3 stages and the cervical vertebrae as growth indicators. *J Clin Orthod.* 2002;36(7):398–406. PMID: 12165981.
 63. Leite HR, O'Reilly MT, Close JM. Skeletal age assessment using the first, second, and third fingers of the hand. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 1987;92(6):492–8. DOI: 10.1016/0889-5406(87)90231-9.
 64. Litsas G, Lucchese A. Dental and Chronological Ages as Determinants of Peak Growth Period and Its Relationship with Dental Calcification Stages. *Open Dent. J.* 2016;10(1):99–108. DOI: 10.2174/1874210601610010099.
 65. Perinetti G, Westphalen GH, Biasotto M, Salgarello S, Contardo L. The diagnostic performance of dental maturity for identification of the circumpubertal growth phases: A meta-analysis. *Prog. Orthod.* 2013;14(1):1–13. DOI: 10.1186/2196-1042-14-8.
 66. Demirjian A, Goldstein H, Tanner JM. A new system of dental age assessment. *Hum. Biol.* 1973;45(2):211–27. PMID: 4714564.
 67. Franchi L, Baccetti T, De Toffol L, Polimeni A, Cozza P. Phases of the dentition for the assessment of skeletal maturity: A diagnostic performance study. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2008;133(3):395–400. DOI: 10.1016/j.ajodo.2006.02.040.
 68. Thiruvenkatachari B, Sandler J, Murray A, Walsh T, O'Brien K. Comparison of twin-block and dynamax appliances for the treatment of class II malocclusion in adolescents: A randomized controlled trial. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2010;138(2):144.e1-144.e9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajodo.2010.01.025>.
 69. Vaughn GA, Mason B, Moon HB, Turley PK. The effects of maxillary protraction therapy with or without rapid palatal expansion: A prospective, randomized clinical trial. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2005;128(3):299–309. DOI: 10.1016/j.ajodo.2005.04.030.
 70. Lagravère MO, Carey JP, Heo G, Toogood RW, Major PW. Transverse, vertical, and

- anteroposterior changes from bone-anchored maxillary expansion vs traditional rapid maxillary expansion: A randomized clinical trial. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2010;137(3):304–5. DOI: 10.1016/j.ajodo.2009.09.016.
71. Baccetti T, Franchi L, De Toffol L, Ghiozzi B, Cozza P. The diagnostic performance of chronologic age in the assessment of skeletal maturity. *Prog. Orthod.* 2006;7(2):176–88. PMID: 17143345.
 72. Suri S, Prasad C, Tompson B, Lou W. Longitudinal comparison of skeletal age determined by the Greulich and Pyle method and chronologic age in normally growing children, and clinical interpretations for orthodontics. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2013;143(1):50–60. DOI: 10.1016/j.ajodo.2012.08.027.
 73. Juul A. Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. *Growth Horm IGF Res.* 2003 Aug;13(4):113-70. DOI: 10.1016/s1096-6374(03)00038-8.
 74. Ishaq RAR, Soliman SAZ, Foda MY, Fayed MMS. Insulin-like growth factor I: A biologic maturation indicator. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2012;142(5):654–61. DOI: 10.1016/j.ajodo.2012.06.015.
 75. Tripathi T, Gupta P, Rai P, Sharma J, Gupta VK, Singh N. Osteocalcin and serum insulin-like growth factor-1 as biochemical skeletal maturity indicators. *Prog. Orthod.* 2017;18(1). DOI: 10.1186/s40510-017-0184-y.
 76. Hill CS, Wolfert RL. The preparation of monoclonal antibodies which react preferentially with human bone alkaline phosphatase and not liver alkaline phosphatase. *Clin. Chim. Acta* 1990;186(2):315–20. DOI: 10.1016/0009-8981(90)90050-3.
 77. Farley JR, Chesnut CH, Baylink DJ. Improved method for quantitative determination in serum of alkaline phosphatase of skeletal origin. *Clin. Chem.* 1981;27(12):2002–7. DOI:10.1093/clinchem/27.12.2002.
 78. Gorman L, Statland BE. Clinical usefulness of alkaline phosphatase isoenzyme determinations. *Clin. Biochem.* 1977;10(C):171–4. DOI: 10.1016/s0009-9120(77)92552-8.
 79. Crofton PM. Properties of alkaline phosphatase isoenzymes in plasma of preterm and term neonates. *Clin. Chem.* 1987;33(10):1778–82. DOI: 10.1093/clinchem/33.10.1778.
 80. Whitaker KB, Whitby LG, Moss DW. Activities of bone and liver alkaline phosphatases in serum in health and disease. *Clin Chim Acta.* 1977 Oct 1;80(1):209-20. DOI: 10.1016/0009-8981(77)90281-9.
 81. Van Hoof VO, Hoylaerta MF, Geryf H, Van Mullern M, Lepoutre LG, De Broe ME. Age and sex distribution of alkaline phosphatase isoenzymes by agarose electrophoresis. *Clin. Chem.* 1990 Jun;36(6):875-8. DOI: 10.1093/clinchem/36.6.875
 82. Blumsohn A, Hannon RA, Wrate R, et al. Biochemical markers of bone turnover in girls during puberty. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 1994;40(5):663–70. DOI: 10.1111/j.1365-2265.1994.tb03019.x.
 83. Gennai I, Di Iorgi N, Reggiardo G, et al. Age- and sex-matched reference curves for serum collagen type I C-telopeptides and bone alkaline phosphatase in children and adolescents: An alternative multivariate statistical analysis approach. *Clin. Biochem.* 2016;49(10–11):802–7. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2016.04.005.
 84. Mora S, Cafarelli L, Erba P, et al. Differential effect of age, gender and puberty on bone formation rate assessed by measurement of bone-specific alkaline phosphatase in healthy Italian children and adolescents. *J. Bone Miner. Metab.* 2009;27(6):721–6. DOI: 10.1007/s00774-009-0092-4.
 85. Kapoor P, Kharbanda OP1, Monga N, Miglani R, Kapila S. Effect of orthodontic forces on cytokine and receptor levels in gingival crevicular fluid: A systematic review. *Prog. Orthod.* 2014;15(1):2–21. DOI: 10.1186/s40510-014-0065-6.

86. Nunes L, Quintanilha L, Perinetti G, Capelli J. Effect of orthodontic force on expression levels of ten cytokines in gingival crevicular fluid. *Arch. Oral Biol.* 2017;76:70–5. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2017.01.016.
87. Taba M Jr1, Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic Biomarkers for Oral and Periodontal Diseases Mario. *Dent Clin North Am* 2005;49(3):551–71. DOI: 10.1016/j.cden.2005.03.009.
88. Barros SP, Williams R, Offenbacher S, Morelli T. Gingival Crevicular as a Source of Biomarkers for Periodontitis. *Periodontol* 2000. 2016;70(1):53–64. DOI: 10.1111/prd.12107.
89. Perinetti G, Contardo L. Gingival crevicular fluid alkaline phosphatase activity in relation to pubertal growth spurt and dental maturation: A multiple regression study. *South Eur. J. Orthod. Dentofac. Res.* 2016;3(1):6–1. DOI: 10.5937/sejodr3-1265.
90. Perinetti G, Baccetti T, Contardo L, Di Lenarda R. Gingival crevicular fluid alkaline phosphatase activity as a non-invasive biomarker of skeletal maturation. *Orthod. Craniofacial Res.* 2011;14(1):44–50. DOI: 10.1111/j.1601-6343.2010.01506.x
91. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 2001;85(2):162–9. DOI: 10.1067/mpr.2001.113778.
92. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva - A review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2002;13(2):197–212. DOI: 10.1177/154411130201300209.
93. Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis. *J Clin Periodontol.* 2000;27(27):453–65. DOI: 10.1034/j.1600-051x.2000.027007453.x.
94. Frodge BD, Ebersole JL, Kryscio RJ, Thomas MV, Miller CS. Bone Remodeling Biomarkers of Periodontal Disease in Saliva. *J. Periodontol.* 2008;79(10):1913–9. DOI: 10.1902/jop.2008.080070.
95. Zhang Y, Sun J, Lin CC, Abemayor E, Wang MB, Wong DT.. The emerging landscape of salivary diagnostics. *Periodontol* 2000. 2016;70(1):38–52. DOI: 10.1111/prd.12099.
96. Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva: Current state and future applications. *Clin. Chem.* 2011;57(5):675–87. DOI: 10.1373/clinchem.2010.153767.
97. Jain N, Tripathi T, Gupta SK, Rai P, Kanase A, Kalra S. Serum IGF-1, IGFBP-3 and their ratio: Potential biochemical growth maturity indicators. *Prog. Orthod.* 2017;18(1):1–8. DOI: 10.1186/s40510-017-0165-1.
98. Flórez-Moreno GA, Marín-Restrepo LM, Isaza-Guzmán DM, Tobón-Arroyave SI. Screening for salivary levels of deoxypyridinoline and bone-specific alkaline phosphatase during orthodontic tooth movement: A pilot study. *Eur. J. Orthod.* 2013;35(3):361–8. DOI: 10.1093/ejo/cjr138.
99. Allen RK, Edelmann AR, Abdulmajeed A, Bencharit S. Salivary protein biomarkers associated with orthodontic tooth movement: A systematic review. *Orthod. Craniofacial Res.* 2019;22(S1):14–20. DOI: 10.1111/ocr.12258.
100. Flórez-Moreno GA, Isaza-Guzmán DM, Tobón-Arroyave SI. Time-related changes in salivary levels of the osteotropic factors sRANKL and OPG through orthodontic tooth movement. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2013;143(1):92–100. DOI: 10.1016/j.ajodo.2012.08.026.
101. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975;25(4):229–35. PMID: 1058834.
102. Mühlemann HR, Son S.. Gingival sulcus bleeding - a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta.* 1971;15(2):107–13. PMID: 5315729.
103. Perinetti G, Paolantonio M, Femminella B, Serra E, Spoto G. Gingival Crevicular Fluid Alkaline Phosphatase Activity Reflects Periodontal Healing/Recurrent Inflammation Phases in Chronic Periodontitis Patients. *J. Periodontol.* 2008;79(7):1200–7. DOI:

- 10.1902/jop.2008.070519.
104. Totan A, Greabu M, Totan C, Spinu T. Salivary aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase: Possible markers in periodontal diseases? *Clin. Chem. Lab. Med.* 2006;44(5):612–5. DOI: 10.1515/CCLM.2006.096.
 105. Navazesh M. Methods for Collecting Saliva. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1993. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb18343.x.
 106. IARC -International Agency for Research on Cancer. Collecting and processing saliva. *Mol. Methods database.* 2012. Available from: <http://www.molmeth.org/protocol/collecting-and-processing-saliva>
 107. dos Santos DR, Souza RO, Dias LB, et al. The effects of storage time and temperature on the stability of salivary phosphatases, transaminases and dehydrogenase. *Arch. Oral Biol.* 2018;85(April 2017):160–5. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2017.10.016.
 108. Gomar-Vercher S, Simón-Soro A, Montiel-Company JM, Almerich-Silla JM, Mira A. Stimulated and unstimulated saliva samples have significantly different bacterial profiles. *PLoS One* 2018;13(6):1–12. DOI: 10.1371/journal.pone.0198021.
 109. Perinetti G, Bianchet A, Franchi L, Contardo L. Cervical vertebral maturation: An objective and transparent code staging system applied to a 6-year longitudinal investigation. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2017;151(5):898–906. DOI: 10.1016/j.ajodo.2016.09.026.
 110. Cohen J. A power primer. *Psychol. Bull.* 1992;112(1):155–9. DOI: 10.1037//0033-2909.112.1.155.
 111. Cohen, J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol. Meas.* 1960;20(1):37-46. DOI: 10.1177/001316446002000104.
 112. Cohen J. Weighted kappa: Nominal scale agreement provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychol. Bull.* 1968;70(4):213–20. DOI: 10.1037/h0026256.
 113. Perinetti G. StaTips Part III: Assessment of the repeatability and rater agreement for nominal and ordinal data. *South Eur. J. Orthod. Dentofac. Res.* 2017;4(1):3–4. DOI: 10.5937/sejodr4-1283.
 114. Moradzadeh N, Ganjali M, Baghfalaki T. Weighted kappa as a function of unweighted kappas. *Commun. Stat. Simul. Comput.* 2017;46(5):3769–80. DOI: 10.1080/03610918.2015.1105975.
 115. Lamparski DG. Skeletal age assessment utilizing cervical vertebrae. 1972. Master of Science Thesis, University of Pittsburgh School of Dental Medicine. Pittsburgh, PA. 1972.
 116. Perinetti G, Caprioglio A, Contardo L. Visual assessment of the cervical vertebral maturation stages a study of diagnostic accuracy and repeatability. *Angle Orthod.* 2014;84(6):951–6. DOI: 10.2319/120913-906.1.
 117. Sohrabi A, Babay Ahari S, Moslemzadeh H, Rafighi A, Aghazadeh Z. The reliability of clinical decisions based on the cervical vertebrae maturation staging method. *Eur. J. Orthod.* 2016;38(1):8–12. DOI: 10.1093/ejo/cjv030.
 118. Szemraj A, Wojtaszek-Słomińska A, Racka-Pilszak B. Is the cervical vertebral maturation (CVM) method effective enough to replace the hand-wrist maturation (HWM) method in determining skeletal maturation?—A systematic review. *Eur. J. Radiol.* 2018;102(August 2017):125–8. DOI: 10.1016/j.ejrad.2018.03.012.
 119. Perinetti G, Primožic J, Sharma B, Cioffi I, Contardo L. Cervical vertebral maturation method and mandibular growth peak: A longitudinal study of diagnostic reliability. *Eur. J. Orthod.* 2018;40(6):666–72. DOI: 10.1093/ejo/cjy018.
 120. Nestman TS, Marshall SD, Qian F, Holton N, Franciscus RG, Southard TE. Cervical vertebrae maturation method morphologic criteria: Poor reproducibility. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2011;140(2):182–8. DOI: 10.1016/j.ajodo.2011.04.013.

121. Madhu S, Hegde AM, Munshi AK. The developmental stages of the middle phalanx of the third finger (MP3): a sole indicator in assessing the skeletal maturity?. *J. Clin. Pediatr. Dent.* 2003;27(2):149–56. DOI: 10.17796/jcpd.27.2.qjt75rg371415543.
122. Hosni S, Burnside G, Watkinson S, Harrison JE. Comparison of statural height growth velocity at different cervical vertebral maturation stages. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2018;154(4):545–53. DOI: 10.1016/j.ajodo.2017.12.016.
123. Kendall MG, Smith BB. The Problem of m Rankings. *Ann. Math. Stat.* 1939;10(3):275–87. DOI: 10.1214/aoms/1177732186.
124. Gracco A, Bruno G, De Stefani A, Siviero L, Perri A, Stellini E. Maturation of the middle phalanx of the third finger: A comparative study between right and left hand. *J. Clin. Pediatr. Dent.* 2018;42(2):161–5. DOI: 10.17796/1053-4628-42.2.14.
125. Özer T, Kama JD, Özer SY. A practical method for determining pubertal growth spurt. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2006;130(2):131.e1-131.e6. DOI: 10.1016/j.ajodo.2006.01.019.
126. Navlani M, Makhija PG. Evaluation of skeletal and dental maturity indicators and assessment of cervical vertebral maturation stages by height/width ratio of third cervical vertebra. *J. Pierre Fauchard Acad. (India Sect).* 2013;27(3):73–80. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpfa.2013.11.001>.
127. Prasad M, Ganji VSK, George SA, Talapaneni AK, Shetty SK. A comparison between cervical vertebrae and modified MP3 stages for the assessment of skeletal maturity. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 2013;4(1):74–80. DOI: 10.4103/0976-9668.107264.
128. Male D, Brostoff J, Roth David B, Roitt I. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. In: ICRP Publication 103. *Ann. ICRP* 37 (2-4). Available from: https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/ANIB_37_2-4.
129. Seibert JA. Tradeoffs between image quality and dose. *Pediatr. Radiol.* 2004;34(SUPPL. 3):183–95. DOI: 10.1007/s00247-004-1268-7.
130. Lis K. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and growth hormone (hGH) as the markers of osteoarthritis. *Chir. Narzadow Ruchu Ortop. Pol.* 2008;73(1):49–52. PMID: 18683531.
131. Shan PF, Wu XP, Zhang H, et al. Age-related changes of serum bone alkaline phosphatase and cross-linked C-telopeptides of type I collagen and the relationship with bone mineral density in Chinese women. *Clin. Chim. Acta* 2006;366(1–2):233–8. DOI: 10.1016/j.cca.2005.10.009.
132. Tripathi T, Gupta P, Sharma J, Rai P, Gupta VK, Singh N. Bone-specific alkaline phosphatase—a potential biomarker for skeletal growth assessment. *J. Orthod.* 2018;45(1):4–10. DOI: 10.1080/14653125.2017.1416571.
133. Rathbone CR, Cross JD, Brown K V., Murray CK, Wenke JC. Effect of various concentrations of antibiotics on osteogenic cell viability and activity. *J. Orthop. Res.* 2011;29(7):1070–4. DOI: Available from: 10.1002/jor.21343.
134. Andrade RJ, Tulkens PM. Hepatic safety of antibiotics used in primary care. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011;66(7):1431–46. DOI: 10.1093/jac/dkr159.
135. Srisridharan R, Sravani P, Satyanarayan A, Kiran K, Shetty V. Salivary alkaline phosphatase as a noninvasive marker for periodontal disease in children with uncontrolled type 1 diabetes mellitus. *J. Clin. Pediatr. Dent.* 2017;41(1):70–4. DOI: 10.17796/1053-4628-41.1.70.
136. Perinetti G, Di Leonardo B, Di Lenarda R, Contardo L. Repeatability of gingival crevicular fluid collection and quantification, as determined through its alkaline phosphatase activity: Implications for diagnostic use. *J. Periodontal Res.* 2013;48(1):98–104. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2012.01508.x.
137. Forde MD, Koka S, Eckert SE, Carr AB, Wong DT. Systemic assessments utilizing saliva: part 1 general considerations and current assessments. *Int. J. Prosthodont.*

- 2006;19(1):43–52. PMID: 16479760.
138. Chiu ML, Lawi W, Snyder ST, Wong PK, Liao JC, Gau V. Matrix Effects-A Challenge Toward Automation of Molecular Analysis. *JALA - J. Assoc. Lab. Autom.* 2010;15(3):233–42. DOI: 10.1016/j.jala.2010.02.001.
 139. Perinetti G, Paolantonio M, D’Attilio M, et al. Alkaline phosphatase activity in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 2002;122(5):548–56. DOI: 10.1067/mod.2002.126154

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado responsável/representante legal,

Este estudo denomina-se “Determinação da fase de crescimento em pacientes jovens através dos níveis da fosfatase alcalina óssea na saliva e das análises radiográficas.”. Seu objetivo é avaliar um método de predição da fase de crescimento através da medição de uma substância na saliva (fosfatase alcalina) e compará-lo a dois métodos radiográficos, de grande utilização na Ortodontia. O procedimento de coleta será feito através da dispensa de saliva em tubos estéreis e descartáveis, sendo indolor e não invasivo. No mesmo dia da coleta, será feita uma radiografia do terceiro dedo do paciente, sem custo ou prejuízo a este. Será solicitada também uma radiografia cefalométrica lateral, exame padrão para o início de qualquer tratamento ortodôntico. A participação é voluntária e não trará malefício ao paciente, assim como não haverá custo adicional ao responsável. Como benefícios na participação do estudo, tem-se a terapia periodontal, instrução de higiene oral e possibilidade de correção da má-oclusão dentária.

Em qualquer etapa do estudo, os responsáveis e pacientes participantes poderão acessar o profissional responsável para informação adicional pelo telefone (21) 2868-8288 e (21) 99587-8046. A liberdade do responsável e/ou participante em recusar o experimento ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, não trará penalização alguma. Para maiores esclarecimentos quanto às questões éticas da pesquisa entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ. Av. Vinte e Oito de Setembro, 77 Térreo - Vila Isabel - Cep 20551-030. TEL: 21 2868-8253 – E-mail: cep-hupe@uerj.br.

Os dados coletados serão mantidos em sigilo, sendo acessados apenas pelos responsáveis pela pesquisa. A saliva será processada, armazenada e avaliada na UERJ, sendo descartada ao final da pesquisa. Os dados gerados neste trabalho são confidenciais e só serão utilizados com fins científicos, como a publicação de artigos, conferências, painéis ou temas-livres.

CONSENTIMENTO

Eu, _____ li e concordo com a participação do menor _____ na pesquisa.

Assinatura do(a) responsável /representante legal	Data: ___/___/___
---	-------------------

Eu, _____ obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do (a) responsável /representante legal pelo (a) menor participante da pesquisa.

Assinatura do(a) pesquisador(a)	Data: ___/___/___
---------------------------------	-------------------

APÊNDICE B - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “Determinação da fase de crescimento em pacientes jovens através dos níveis da fosfatase alcalina óssea na saliva e das análises radiográficas.”. Queremos saber em que fase do crescimento você está e para isso, usaremos dois tipos de radiografia, que já seriam feitas para você começar seu tratamento ortodôntico e a medição da quantidade de uma substância específica (fosfatase alcalina) da saliva. Todos temos essa substância na saliva, mas seus níveis variam durante a fase de crescimento. Estes exames serão comparados, para saber se determinam a mesma fase do crescimento.

As pessoas que irão participar desta pesquisa têm de 7 a 18 anos de idade. A pesquisa será feita no(a) departamento de Ortodontia da UERJ. Durante a pesquisa, faremos um exame da sua gengiva, limpeza dentária e instrução de higiene oral. Depois, marcaremos uma consulta pela manhã, onde você dispensará sua saliva em tubos estéreis e descartáveis e fará as radiografias necessárias. Para isso, será usado o material odontológico adequado. Caso aconteça algo errado, você pode procurar a pesquisadora Mariana Sobral pelo telefone (21) 2868-8288 ou (21) 99587-8046.

Você não precisa participar desta pesquisa se não quiser. Ninguém ficará irritado(a) ou chateado(a) com você se você disser “não”: a escolha é sua. Você pode pensar nisto e falar depois se você quiser. Você pode dizer “sim” agora e mudar de ideia depois e tudo continuará bem. É importante que você converse com seus responsáveis sobre a sua decisão. Saiba o que eles acham, fale a eles o que pretende fazer, se quer ou não participar. Você tem o tempo que precisar para isso. Também pode discutir com o(a) pesquisador(a), quando quiser. Ele(a) responderá todas as suas dúvidas, em qualquer momento.

Você não receberá nenhum dinheiro nem terá que pagar nada para participar da pesquisa. Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as pessoas que participaram da pesquisa.

ASSENTIMENTO

Eu _____ li este termo e aceito participar da pesquisa.

Assinatura do(a) participante	Data: ___/___/___
-------------------------------	-------------------

Eu, _____ obtive de forma apropriada e voluntária o Assentimento Livre e Esclarecido do participante da pesquisa.

Assinatura do(a) pesquisador(a).	Data: ___/___/___
----------------------------------	-------------------

ANEXO A – Manual do *kit* de análise

“Human Bone Alkaline Phosphatase, BALP ELISA Kit”

Sample preparation

1) We are only responsible for the kit itself, but not for the samples consumed during the assay. The user should calculate the possible amount of the samples used in the whole test. Please reserve sufficient amount of samples in advance.

2) Please predict the concentration before assaying. If values for these are not within the range of the standard curve, users must determine the optimal sample dilutions for their particular experiments. We suggest pre-experimenting with neat (undiluted) samples, 1:2 or 1:4 dilutions. Please avoid diluting your samples more than 1:10 as it would exceed the dilution limit set for this kit. If the expected concentration of the target is beyond the detection range of the kit, please contact technical support.

3) If the samples are not indicated in the manual, a preliminary experiment to determine the validity of the kit is necessary.

4) Owing to the possibility of mismatching between antigen from other resource and antibody used in our kits (e.g., antibody targets conformational epitope rather than linear epitope), some native or recombinant proteins from other manufacturers may not be recognized by our products.

5) Influenced by the factors including cell viability, cell number and also sampling time, samples from cell culture supernatant may not be detected by the kit.

Reagents preparation

1) Bring all kit components and samples to room temperature (20-25 °C) before use.

2) Samples - Please predict the concentration before assaying. If concentrations are unknown or not within the detection range, a preliminary experiment is recommended to determine the optimal dilution. PBS (pH 7.0-7.2) or 0.9% physiological saline can be used as dilution buffer.

3) Wash Solution - Dilute 10 mL of Wash Solution concentrate (100×) with 990 mL of deionized or distilled water to prepare 1000 mL of Wash Solution (1×). If crystals have formed in the concentrate, warm to room temperature and mix gently until the crystals have

completely dissolved. The 1× wash solution is stable for 2 weeks at 2-8°C.

- 4) Do not dilute the other components which are ready- to-use.

Assay procedure

Please read Reagents Preparation before starting assay procedure. It is recommended that all Standards and Samples be added in duplicate to the microtiter plate. It is strongly recommended to do a preliminary experiment before measuring all samples.

- 1) Secure the desired numbers of coated wells in the holder then add 50 µL of Standards (Shake the bottle of each standard gently by hand and Pipette up and down the solution of standard for 3 times before adding) or Samples to the appropriate well. Add 50 µL of PBS (pH 7.0-7.2) in the blank control well. Cover and incubate the plate overnight at 4°C.
- 2) Wash the microtiter on the next day.
- 3) Dispense 5 µL of Balance Solution into 50 µL samples only, mix well. (NOTE: This step is required when the sample is cell culture supernatants, body fluid and tissue homogenate; if the sample is serum or plasma, then this step should be skipped.)
- 4) Add 100 µL of Conjugate to each well (NOT blank control well). Mix well. Mixing well in this step is important. Cover and incubate the plate for 1 hour at 37°C.
- 5) Wash the microtiter plate using one of the specific methods indicated below:
 - a) Manual Washing: Remove incubation mixture by aspirating contents of the plate into a sink or proper waste container. Fill in each well completely with 1x wash solution, and then aspirate contents of the plate into a sink or proper waste container. Repeat this procedure five times for a total of FIVE washes. After washing, invert plate, and blot dry by hitting the plate onto absorbent paper or paper towels until no moisture appears. Note: Hold the sides of the plate frame firmly when washing the plate to assure that all strips remain securely in frame. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance.
 - b) Automated washing: wash plate five times with diluted wash solution (350-400 µL/well/wash) using an auto washer. After washing, dry the plate as above. It is recommended that the washer be set for soaking time of 10 seconds and shaking time of 5 seconds between each wash.
- 6) Add 50 µL Substrate A and 50 µL of Substrate B to each well including blank control well, subsequently. Cover and incubate for 15-20 minutes at 37C (Avoid sunlight. If

- the color is not dark, please prolong the incubation time, but longest time is 30 min)
- 7) Add 50 μL pf Stop Solution to each well including blank control. Mix well.
 - 8) Determine the optical density (O.D.) at 450 nm using a microplate reader immediately.

Calculation of results

- 1) The standard curve is used to determine the amount of samples.
- 2) First, average the duplicate readings for each standard and sample. All O.D. values are subtracted by the mean value of blank control before result interpretation.
- 3) Construct a standard curve by plotting the average O.D. for each standard on the horizontal (X) axis against the concentration on the vertical (Y) axis, and draw a best fit curve using graph paper or statistical software to generate a linear regression, four parameter logistic (4-PL) curve-fit, or curvilinear regression of a second degree. An x-axis for the optical density and a y-axis for the concentration is also a choice. The data may be linearized by plotting the log of the concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis.
- 4) Calculate the concentration of samples corresponding to the mean of absorbance from the standard curve.

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação da fase de crescimento de paciente jovens através dos níveis de fosfatase alcalina óssea na saliva e da análise radiográfica

Pesquisador: MARIANA CAIRES SOBRAL DE AGUIAR

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 16425819.0.0000.5259

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da UERJ

Patrocinador Principal: Capes Coordenação Aperf Pessoal Nível Superior
FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.550.517

Apresentação do Projeto:

Continuação do Parecer: 3.461.419

Objetivo da Pesquisa:

Continuação do Parecer: 3.461.419

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Continuação do Parecer: 3.461.419

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Foram atendidas as considerações do Parecer anterior. A pesquisa está bem estruturada e o referencial teórico e metodológico estão explicitados, demonstrando aprofundamento e conhecimento necessários para sua realização. As referências estão adequadas e a pesquisa é exequível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram analisados os seguintes documentos de apresentação obrigatória:

- 1) Folha de Rosto para pesquisa envolvendo seres humanos: Documento devidamente preenchido.

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo	CEP: 20.551-030
Bairro: Vila Isabel	
UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253	E-mail: osp.hupe.interno@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.550.517

datado e assinado

- 2) Projeto de Pesquisa: Adequado
- 3) Orçamento financeiro e fontes de financiamento: adequado/apresentado
- 4) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ou Justificativa: Adequado
- 5) Cronograma: pertinente as informações
- 6) Documentos pertinentes à inclusão do HUPE: Adequado
- 7) Currículo do pesquisador principal e demais colaboradores: anexados e conforme as normas.

Os documentos de apresentação obrigatória foram enviados a este Comitê, estando dentro das boas práticas e apresentando todos dados necessários para apreciação ética e tendo sido avaliadas as informações contidas na Plataforma Brasil e as mesmas se encontram dentro das normas vigentes e sem riscos iminentes aos participantes envolvidos de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto pode ser realizado da forma como está apresentado. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em consonância com a resolução CNS 466/12 e a Norma Operacional CNS 001/13, o CEP recomenda ao Pesquisador: Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e no termo de consentimento livre e esclarecido, para análise das mudanças; Informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa; O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que encaminhe relatórios parciais de andamento a cada 06 (seis) Meses da pesquisa e ao término, encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto; Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P	19/07/2019		Aceito

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
 Bairro: Vila Isabel CEP: 20.551-030
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2868-8253 E-mail: cep_hupe_interno@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.550.517

Básicas do Projeto	ETO_1262464.pdf	23:22:12		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_RESPONSAVEL_MENOR.pdf	19/07/2019 23:18:17	MARIANA CAIRES SOBRAL DE AGUIAR	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE.pdf	19/07/2019 23:17:53	MARIANA CAIRES SOBRAL DE AGUIAR	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Vinculo_pesquisador.pdf	09/05/2019 15:42:28	MARIANA CAIRES SOBRAL DE AGUIAR	Aceito
Folha de Rosto	Folha_De_Rosto.pdf	20/04/2019 22:00:17	MARIANA CAIRES SOBRAL DE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Plataforma.pdf	20/04/2019 21:09:03	MARIANA CAIRES SOBRAL DE AGUIAR	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 03 de Setembro de 2019

Assinado por:
WILLE OIGMAN
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
 Bairro: Vila Isabel CEP: 20.551-030
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2868-8253 E-mail: cep_hupe_interno@gmail.com