



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

CAMILA LOPES FERREIRA

**EFEITO CONCOMITANTE DA DOENÇA PERIODONTAL
INDUZIDA E MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA EM RATOS
SUBMETIDOS À INALAÇÃO DA FUMAÇA DE CIGARRO:
estudo histomorfométrico.**

2016

CAMILA LOPES FERREIRA

**EFEITO CONCOMITANTE DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA E
MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA EM RATOS SUBMETIDOS À
INALAÇÃO DA FUMAÇA DE CIGARRO: estudo histomorfométrico.**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Prof^a Adj. Maria Aparecida Neves Jardimi

Co-orientador: Prof. Dr. Milton Santamaria Junior

São José dos Campos

2016

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2016.

Ferreira, Camila Lopes

Efeito concomitante da doença periodontal induzida e movimentação
ortodôntica em ratos submetidos à inalação da fumaça de cigarro: estudo
histomorfométrico. / Camila Lopes Ferreira. - São José dos Campos :
[s.n.], 2016.

56 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2016.

Orientadora: Maria Aparecida Neves Jardimi

Co-orientador: Milton Santamaria Junior.

1. Doenças periodontais. 2. Movimentação dentária. 3. Tabaco. I.
Jardini, Maria Aparecida Neves, orient. II. Santamaria Junior,
Milton, co-orient. III. Instituto de Ciência e Tecnologia de São
José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. IV. Universidade
Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. V. UNESP - Univ
Estadual Paulista. VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 13 de janeiro de 2016
E-mail: camila.ferreira@ict.unesp.br

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adjunta Maria Aparecida Neves Jardim (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus São José dos Campos

Profa. Dra. Cibelle Barbosa Lopes

Prof. Dr. Weber José da Silva Ursi

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus São José dos Campos

São José dos Campos, 13 de janeiro de 2016.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,
Ana Lúcia Porto Lopes e Carlos Benedito Ferreira,
pelo amor, carinho, dedicação, exemplo e puxões de orelha.
Por terem me presenteado com a Vida.

Aos meus avós maternos e paternos,
presentes sempre em minha vida, seja fisicamente ou espiritualmente.

À minha irmã,
Samira Lopes Ferreira,
que me mantém atendida.
Se tivesse a chance de escolher uma irmã, escolheria você!

À minha tia,
Marta Porto Meleiro,
pelo xodó e
por ter me apresentado à sala de aula, de modo muito peculiar.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Mauro Pedrine Santamaria por ter me dado uma ideia e apresentado um novo caminho. Pela participação da banca do EGQ.

À Prof^a Maria Aparecida Neves Jardini, minha orientadora, por acreditar no meu potencial e ter aceitado meu pedido de orientação, novamente.

Ao Prof^o Milton Santamaria Junior, meu co-orientador, por todo trabalho dispensado na execução do projeto e conhecimento compartilhado.

À UNESP, ao Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, pela infraestrutura e serviços prestados aos alunos.

À CAPES pela concessão de bolsa.

À Prof^a Monica Fernandes Gomes por disponibilizar o CEBAPE e compor a banca do Exame Geral de Qualificação.

Aos funcionários do ICT/UNESP em seus diversos setores como triagem, esterilização, biblioteca, secretaria, informática, saúde, limpeza e portaria.

À Marcinha e Jaque por todo apoio prestado nas clínicas.

À Salete, Ana e Valter pela ajuda e conhecimento passado sobre processamento histológico.

Ao Sr. Toninho e André pelo convívio e aprendizado no biotério.

Às amigas Camila Magnoni Moretto Nunes e Daniela Vicensotto Bernardo por terem participado ativamente na execução deste trabalho, deixando a rotina mais alegre.

Aos amigos feitos durante esse período, em especial aos que compõem a Linha de Pesquisa: “*Estudos sobre microbiologia, imunologia e terapia em periodontia e implantodontia*”.

EPÍGRAFE

“Quando nos dedicamos a um trabalho que nos proporciona alegria de viver, tornamo-nos mais vigorosos quanto mais trabalhamos.”

*Fonte: Ai to Hikari to no Seikatsu
Você é dono de potencialidade infinita
Masaharu Taniguchi
Kamino Kusumoto*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3 PROPOSIÇÃO.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Amostra.....	21
4.1.1 Distribuição da amostra.....	21
4.2 Inalação da fumaça de cigarro.....	23
4.3 Indução da doença periodontal.....	24
4.4 Instalação do dispositivo para a movimentação ortodôntica.....	25
4.5 Período experimental.....	26
4.6 Preparo e análise histomorfométrica.....	27
4.7 Medida macroscópica: movimentação dentária (mm).....	28
4.8 Morfometria em microscopia convencional.....	29
4.8.1 Área da perda óssea.....	30
4.8.2 Densidade óssea.....	33
4.9 Análise estatística.....	35
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Movimentação dentária.....	37
5.2 Perda óssea.....	39
5.3 Densidade óssea.....	40
6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÃO.....	48

8 REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO A.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem digital editada representando o mecanismo de exposição à fumaça.....	24
Figura 2 – Ligadura para a indução de doença periodontal.....	25
Figura 3 – Instalação do dispositivo ortodôntico.....	26
Figura 4 – Mensuração da movimentação dentária	29
Figura 5 – Calibração da medida.....	31
Figura 6 – Mensuração da área de furca.....	32
Figura 7 – Mensuração da densidade óssea.....	34
Figura 8 – Fotomicrografia da região de furca do 1º molar inferior....	37
Figura 9 – Médias e desvios-padrão da movimentação dentária.....	38
Figura 10 – Gráfico das médias e desvios-padrão para perda óssea na furca.....	40
Figura 11 – Médias e desvios-padrão da proporção de tecido ósseo, 1000 µm abaixo da crista óssea na região de furca.....	41

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Representação esquemática da amostra com os grupos experimentais.....	23
Quadro 2 – Linha do tempo do período experimental.....	27
Tabela 1 – Média e desvio-padrão para movimentação dentária.....	38
Tabela 2 – Média de desvio padrão da perda óssea.....	39
Tabela 3 – Média e desvio-padrão para densidade óssea.....	41

Ferreira CL. Efeito concomitante da doença periodontal induzida e movimentação ortodôntica em ratos submetidos à inalação da fumaça de cigarro: estudo histomorfométrico [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2016

RESUMO

Este estudo avaliou as reações do tecido periodontal em ratos submetidos à inalação da fumaça de cigarro associado à doença periodontal e movimentação dentária induzida experimentalmente. Sessenta animais com 90 dias de idade e pesando em média 300g foram separados aleatoriamente nas condições fumantes (n=30) e não fumantes (n=30). Independente da condição sistêmica atribuída, 15 animais receberam na hemimandíbula direita a indução da doença periodontal juntamente com a movimentação ortodôntica (DP+O) e a hemimandíbula esquerda do mesmo animal foi induzida somente a doença periodontal (DP) por meio de ligadura. Outros 15 animais receberam na hemimandíbula direita somente a movimentação ortodôntica (O) e a hemimandíbula esquerda serviu como controle positivo (C+). A exposição à fumaça de cigarro foi iniciada dois meses antes e manteve-se por todo o período experimental até o sacrifício. Foi obtida medida macroscópica para a movimentação dentária imediatamente após o sacrifício. As lâminas foram confeccionadas e coradas em HE. Foi avaliada a área da perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior e a densidade óssea, região considerada 1000 µm abaixo da crista óssea interradicular. Foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk de igualdade de variâncias e utilizado o teste ANOVA de dois fatores com nível de significância de 5 %. Não houve diferença estatisticamente significativa entre fumante e não fumante. A perda óssea entre DP e DP+O não apresentou significância entre si, diferenciando-se ambas de O e C+. Na densidade óssea DP+O foi diferente apenas para o controle. Na movimentação dentária, DP+O foi maior e significativa que nas demais situações, porém não houve diferença entre DP+O e O na condição fumante. Portanto, concluímos que a inalação da fumaça de cigarro não teve influência nos grupos avaliados. Porém, a doença periodontal induzida, associada ou não a movimentação ortodôntica causou maior perda óssea em ambos os grupos.

Palavras-chave: Doenças periodontais. Movimentação dentária. Tabaco.

Ferreira CL. Concomitant effect of induced periodontal disease and orthodontic movement in rats exposed to inhalation of cigarette smoke: histomorphometric study [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2016

ABSTRACT

This study evaluated the reactions of periodontal tissue in rats exposed to inhalation of cigarette smoke associated with periodontal disease and tooth movement induced experimentally. Sixty animals at 90 days of age and weight approximately 300g were randomly separated in smokers (n= 30) and non-smokers (n = 30) conditions. Regardless of systemic condition, 15 animals received in the right hemimandible induction of periodontal disease with orthodontic movement (PD+O) and left hemimandible of the same animal was only induced periodontal disease (PD) by ligature. Another 15 animals received the right hemimandible only orthodontic movement (O) and left hemimandible served as positive control (C+). Exposure to cigarette smoke was started two months before and was kept throughout the trial period until the sacrifice. Immediately after sacrifice, a macroscopic measure was done, which was called tooth movement, realized by a caliper rule. The slices were prepared and stained with HE. Bone loss area was evaluated in the furcation region of the first molar and bone density, and it was considered 1000 µm below the of the interradicular bone crest. The Shapiro-Wilk normality test of equal variances was applied. So we used the ANOVA two factors with 5 % significance level. There was no statistically significant difference between smokers and nonsmokers. Bone loss between PD and PD+O showed no difference between themselves, but were different from O and C+, in both. The bone density was different DP+O only the control. On tooth movement measure, DP+O were higher and significant than in the others situations, but there was no difference between DP+O and O in smoker condition. Therefore, we conclude that inhalation of cigarette smoke did not influence the evaluation groups. But, the induced periodontal disease, with or without orthodontic tooth movement, caused increased bone loss in both groups.

Keywords: Periodontal diseases. Tooth movement. Tobacco.

1 INTRODUÇÃO

A movimentação dentária induzida é um processo biológico múltiplo caracterizado por reações sequenciais do tecido periodontal em resposta às forças biomecânicas. As modificações teciduais induzidas na movimentação dentária estão relacionadas à sua remodelação por ativação da reabsorção óssea alveolar no lado de pressão e consequente aposição óssea do lado de tensão. Os estímulos gerados em resposta ao estresse mecânico durante a movimentação dentária induzida medeiam alterações teciduais que em conjunto com a ativação dos mediadores químicos resultam em nova condição de homeostasia periodontal (Toms et al., 2000).

A inflamação é um importante requisito para a movimentação dentária induzida. A ativação de células inflamatórias e a consequente liberação de citocinas inflamatórias apresentam importante função sobre os tecidos mineralizados (Tønder, 1983; Lara et al., 2003). A fase inicial da movimentação dentária estimula a liberação de fatores químicos e elétricos das fibras nervosas sensoriais e desencadeiam resposta inflamatória que modifica a microcirculação, acompanhada por migração de leucócitos a partir dos capilares sanguíneos (Ogawa et al., 2002; Perinetti et al., 2002). Esses eventos produzem alterações no osso circunjacente, onde há processo contínuo de remodelação, constituído pelas etapas de ativação, reabsorção, fase reversa e formação. Todas controladas por mediadores químicos e citocinas pró-inflamatórias que são alteradas pela aplicação de forças ortodônticas (Heller, Nanda, 1979).

A doença periodontal é caracterizada pela inflamação dos tecidos gengival e periodontal induzida pelo biofilme bacteriano e que leva à destruição dos tecidos periodontais e perda dos elementos dentais.

Desta forma, a movimentação ortodôntica associada à doença periodontal pode ocasionar maior perda óssea do que somente a doença periodontal. Outros autores concluíram que a movimentação dentária pode aumentar o risco de perda óssea durante esse processo (Bensch et al., 2003).

Atualmente é cada vez maior o número de pacientes adultos que procuram terapia ortodôntica (Ren et al., 2014), sendo que essa terapia não é mais exclusividade de crianças e adolescentes. Isso faz com que cada vez mais, a terapia ortodôntica seja realizada em indivíduos adultos que frequentemente apresentam mais doença periodontal, o que poderia influenciar na movimentação ortodôntica como também a perda óssea. Além disso, muitos desses pacientes adultos são fumantes (Susin et al., 2004), o que poderia aumentar a quantidade de movimentação dentária, assim como, a perda óssea e ainda influenciar na densidade do tecido ósseo.

O cigarro é composto por uma grande variedade de substâncias tóxicas e causa diversos efeitos sistêmicos. Seu principal componente é a nicotina, conhecida por interagir com receptores acetilcolina nicotínicos em vários tipos celulares (Nociti et al., 2001 e 2002; Rothem et al., 2009). Também é um componente de dependência do tabaco, sendo um alcalóide altamente tóxico. E, tem sido o foco de diversos estudos avaliando a relação entre os componentes do cigarro e o metabolismo ósseo (Giorgetti et al., 2010). O tabaco está associado à perda óssea alveolar pelo fato de seu principal componente, a nicotina, atuar sobre a regulação da atividade da fosfatase alcalina e deposição de cálcio (Yuhara et al., 1999).

Estudos realizados por Cesar-Netto et al. (2003, 2005, 2006) mostraram que quando o uso da nicotina por si só, foi comparado à exposição a fumaça do cigarro, observou-se que o último foi mais prejudicial para o metabolismo ósseo sugerindo que os constituintes da fumaça de cigarro (por exemplo, metais pesados tóxicos, bifenilos

policlorados, dioxinas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), diferentes da nicotina, podem ser responsáveis pelo impacto negativo de fumar sobre o osso. Apesar disso, os mecanismos pelos quais o cigarro exerce seu efeito negativo sobre esse tecido ainda não são totalmente compreendidos.

O uso de nicotina acelera a movimentação ortodôntica e seu efeito é dose-dependente. Alterações no metabolismo ósseo, diminuição no calibre de vasos, indução de COX-2, relacionado à produção de PGE-2, aumento nas funções reabsortivas dos osteoclastos e produção de citocinas da reabsorção óssea, como IL-1 induzida pela presença de nicotina, podem ser responsáveis por essa observação (Sodagar et al., 2011). Outros autores revelaram que a exposição do organismo à nicotina afeta o metabolismo ósseo pela modulação da proliferação de osteoblastos e formação de citocinas de reabsorção óssea IL-1 e IL-6 em elevados níveis (Hapidin et al., 2007).

Porém, não há na literatura estudos que avaliem a ação concomitante da doença periodontal e da movimentação ortodôntica associada à inalação da fumaça de cigarro. Assim, o presente estudo tem a finalidade de avaliar essa hipótese.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O movimento dentário ocorre em resposta a aplicações de forças ortodônticas. No entanto, este movimento não é completamente regulado pelas leis da física e, portanto, não é imediato ou linear em resposta a magnitude da força. O conhecimento da resposta biológica desempenha um papel central no controle do movimento ortodôntico, isto é, a taxa de reabsorção óssea no sentido do movimento determina a taxa de movimento do dente (Alikhani et al., 2015).

A biologia da movimentação dentária compreende o estudo dos fenômenos celulares, bioquímicos e moleculares que ocorrem no ligamento periodontal e do osso alveolar, nesta circunstância muito especial, que é o tratamento ortodôntico. O movimento dentário induzido tem como princípio a quebra tecidual e celular (tensigridade), transformando um estímulo mecânico em um fenômeno biológico (mecanotransdução), por meio da mecânica ortodôntica aplicada, promovendo em última instância a remodelação óssea, modificando a posição dentária de forma estável e duradoura; ao mesmo tempo, evitando efeitos indesejáveis, como as reabsorções radiculares (Santamaria Junior, 2009).

A cinética celular do ligamento periodontal gera informações que definem os eventos de proliferação e diferenciação durante a reação ortodôntica, sendo fundamental para indução mecânica da osteogênese e da osteoclasia (Sella et al., 2012). Sabe-se que a remodelação óssea durante o movimento ortodôntico é descrito como um processo contínuo e balanceado, caracterizado pela reabsorção no sítio de pressão e deposição no sítio de tensão. Ainda, que esse processo é mais complexo (Perinetti et al., 2002), pois envolve um processo

inflamatório. Alterações vasculares e celulares foram os primeiros eventos a serem reconhecidos e descritos, e um número de mediadores inflamatórios, fatores de crescimento, e neuropeptídeos foram demonstrados em tecidos periodontais. As células podem comunicar-se através da interação de citocinas e outras moléculas afins (Baker, 2000; Yamaguchi, 2009). Dessa forma, a produção de PGE₂, citocinas inflamatórias, e o sistema RANK-RANKL estão envolvidos na regulação do movimento dentário ortodôntico. Estudos recentes mostram que forças ortodônticas alteram os níveis de OPG, RANK, RANKL no fluido crevicular gengival durante movimentação ortodôntica. Também tem sido relatado que a compressão das células do ligamento periodontal em casos de grave reabsorção apical externa podem produzir uma grande quantidade de RANKL, e contribuir para a osteoclastogênese. Portanto, o sistema RANK/RANKL/OPG pode fornecer um elo importante entre remodelação óssea, movimentação ortodôntica, e reabsorção radicular durante o movimento ortodôntico (Yamaguchi, 2009).

Muitos fatores podem afetar a quantidade de movimentação dentária independente da magnitude da força. Estes fatores podem ser intrínsecos ou extrínsecos, tais como: diferenças na forma da raiz e do osso alveolar, a densidade óssea, ou, como forças oclusais e hábitos parafuncionais. Alikhani et al. (2015) investigaram a expressão e atividade dos marcadores inflamatórios em diferentes magnitudes de força e correlacionou esta resposta com outros eventos moleculares e celulares durante a movimentação ortodôntica, concluindo que o aumento da magnitude da força ortodôntica não pode aumentar a resposta biológica e, portanto, não pode ser justificada como uma metodologia para aumentar a taxa de movimentação do dente.

Em uma revisão sobre entendimento dos mecanismos da reabsorção óssea relacionado com a doença periodontal, em nível molecular e celular conclui-se que a reabsorção óssea através de osteoclastos e formação de osso através de osteoblastos são eventos em

equilíbrio, e o seu desequilíbrio está associado com numerosas doenças do sistema esquelético. Uma gama de fatores do hospedeiro e da microbiota local contribui para perda óssea alveolar em periodontite. Ainda, há muito a ser entendido sobre os complexos mecanismos pelo qual estes fatores regulam a reabsorção óssea em periodontite e, os recentes desenvolvimentos na área de processos biológicos e mediadores da diferenciação e da atividade dos osteoclastos têm expandido o conhecimento dos processos de reabsorção e definindo novas modalidades diagnósticas e terapêuticas para tratar situações de perda óssea localizada como visto na doença periodontal (Hienz et al., 2015).

A periodontite é caracterizada pela destruição do ligamento periodontal e óssea. A reabsorção do osso alveolar ocorre como resultado do desequilíbrio do processo normalmente equilibrado de reabsorção óssea e a formação de osso. Citocinas, quimiocinas e prostaglandinas foram identificados como reguladores do processo imunoinflamatório na periodontite. Linfócitos, macrófagos e neutrófilos são ativados no tecido gengival inflamado e secretam mediadores inflamatórios, incluindo a IL-1 e PGE-2. Em adição, células T helper-1, linfócitos T helper-2, que estão presentes em lesões periodontais, aumentam a produção de IL-1 pro-inflamatória e TNF-alfa. Estas citocinas podem induzir a reabsorção óssea indiretamente, por promover a diferenciação de precursores de osteoclastos e pela ativação das células clásticas (Ishikawa, 2007).

Entre os fatores ambientais conhecidos que afetam a incidência e gravidade da periodontite, o hábito de fumar se destaca como um dos mais significativos e evitáveis fatores de risco. Fumantes aumentam o risco de destruição periodontal, através da estimulação das respostas inflamatórias, prejudicando a proteção e reparação das respostas do hospedeiro (Ishikawa, 2007). A nicotina e os demais componentes do cigarro podem alterar a vascularização periférica, o

recrutamento e função das células do sistema imune, o aumento de citocinas pro-inflamatórias, a produção de colágeno e a atividade dos osteoclastos, favorecendo a destruição do tecido ósseo (Pavone et al., 2015).

A fumaça pode ser dividida em duas fases: a de vapor e de partículas (Smith, Fischer, 2001). Fumar produz uma mudança no equilíbrio normal entre oxidantes e antioxidantes, causando estresse oxidativo tanto nos pulmões e sistemicamente. Oxidantes incluídos na fumaça do cigarro podem ferir diretamente células e tecidos, inativar os mecanismos de defesa, e iniciar a inflamação, o que eleva ainda mais o stress oxidativo. É difícil, se não impossível, determinar se os oxidantes responsáveis pela tensão são aqueles originalmente incluídos no fumo do cigarro ou as que resultam da resposta inflamatória associada (Fischer et al., 2015).

A inalação passiva ou ativa da fumaça de cigarro resulta na rápida dissolução de toxinas no revestimento epitelial oral e das vias aéreas e absorção sistêmica (Lee et al., 2012). Embora, existam campanhas globais para a cessação do tabagismo, infelizmente, o uso do cigarro, na verdade, está aumentando em nível global (Samet, Wipfli, 2010; Lee et al., 2012).

3 PROPOSIÇÃO

Analisar as reações dos tecidos periodontais frente à doença periodontal induzida juntamente com a movimentação dentária, em ratos submetidos à inalação de fumaça de cigarro (Grupo Teste), e não expostos à fumaça de cigarro (Grupo Controle).

Mensurar macroscopicamente a movimentação dentária. E, por meio de histomorfometria, avaliar a perda óssea e a densidade óssea na região de furca.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) com protocolo nº 1/2014-PA/CEP. (Anexo A)

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, albinos) do gênero masculino, com 90 dias de idade, pesando em média 300g. Estes foram mantidos no biotério da própria faculdade, em gaiolas plásticas específicas para este fim, na proporção de seis animais por gaiola, forrada com raspa de madeira seca (maravalha de pinus), sendo substituída diariamente, proporcionando as condições de higiene necessárias ao bem-estar e à saúde dos animais. Os animais foram mantidos em temperatura ambiente, recebendo suprimento constante de água potável e alimentação com dieta padrão, constituindo-se de ração (Guabi – Nutrilabor, Campinas, Brasil)

4.1.1 Distribuição da amostra

A amostra foi constituída de 60 ratos divididos nas condições: fumante (grupo teste) e não fumante (grupo controle), avaliados durante a movimentação dentária induzida (O), nas variáveis: com e sem doença periodontal (DP).

Desta forma, dentro de cada condição, temos a seguinte distribuição para cada variável (Quadro 1):

- a) fumante (n= 30): Animais que receberam inalação da fumaça de cigarro durante dois meses;
- b) não fumante (n=30): Animais que não foram expostos à fumaça de cigarro.

Dentro de cada condição, houve a divisão em subgrupos, como mencionados abaixo:

- a) fumante I (n=15): os animais receberam na hemimandíbula direita (MD), a indução da doença periodontal + movimentação ortodôntica e na hemimandíbula esquerda (ME) apenas a indução da doença periodontal;
- b) fumante II (n=15): os animais receberam na hemimandíbula direita, a movimentação ortodôntica e a hemimandíbula esquerda (sem a movimentação ortodôntica e sem doença periodontal) serviu como controle positivo;
- c) não Fumante I (n=15): os animais receberam na hemimandíbula direita, a indução da doença periodontal + movimentação ortodôntica e na hemimandíbula esquerda apenas a indução da doença periodontal;
- d) não Fumante II (n=15): os animais receberam na hemimandíbula direita, a movimentação ortodôntica e a hemimandíbula esquerda (sem a movimentação ortodôntica e sem doença periodontal) serviu como controle positivo.

Quadro 1 - Representação Esquemática da Amostra com os Grupos Experimentais. Entende-se, n: quantidade de animais; HD: hemimandíbula direita; HE: hemimandíbula esquerda; DP: doença periodontal; O: movimentação ortodôntica; C+: controle positivo

FUMANTE (n=30)				NÃO FUMANTE (n=30)			
Fumante I n=15		Fumante II n=15		Não Fumante I n=15		Não Fumante II n=15	
HD	HE	HD	HE	HD	HE	HD	HE
DP+O	DP	O	C+	DP+O	DP	O	C+

4.2 Inalação da fumaça de cigarro

A metodologia utilizada para a exposição dos animais à fumaça foi descrita inicialmente por Le Mesurier et al. (1981) e modificada no laboratório de pneumologia da Escola Paulista de Medicina (Cendon et al., 1997). Esta metodologia foi adaptada por Nociti et al. (2002). Observou-se em estudos prévios que ela promovia níveis séricos de cotinina semelhantes aos observados em fumantes que consomem cerca de 20 cigarros por dia (César-Neto et al., 2003).

Resumidamente, este modelo utiliza um recipiente de acrílico (45x25x20 cm), onde cinco animais de cada vez, são expostos à fumaça de 10 cigarros com concentração de 1,3 mg de nicotina, 16,5 mg de alcatrão e 15,2 mg de monóxido de carbono por três períodos diários de 8 minutos cada. O recipiente é composto por duas câmaras interligadas por um orifício. Na primeira ficam armazenados os cigarros acesos. Nesta parte, há também uma entrada onde é bombeado ar, formando uma corrente que leva a fumaça para a segunda câmara, onde ficam os animais. Na segunda câmara, há outro orifício que dá vazão ao ar bombeado (Figura 1).

Os animais foram submetidos à inalação da fumaça de cigarro, seguindo os parâmetros acima descritos, dois meses antes da realização da indução da doença periodontal. O cigarro utilizado foi da marca MINISTER King size Unique (Souza Cruz) contendo os seguintes ingredientes básicos: mistura de fumos, açúcar, papel de cigarros, 10 mg de alcatrão, 0,8 mg de nicotina, 10 mg de monóxido de carbono, de acordo com as informações do rótulo do produto.

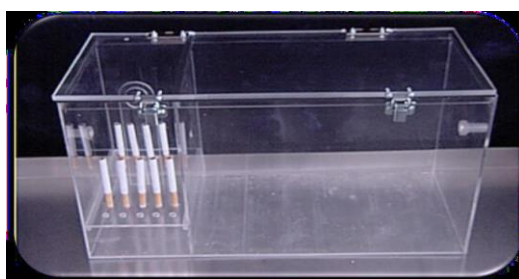


Figura 1 - Imagem digital editada representando o mecanismo de exposição à fumaça. (César-Neto et al., 2003).

4.3 Indução da doença periodontal

A indução da doença periodontal foi realizada por um único cirurgião (CLF), responsável pela realização dos procedimentos. Os animais foram anestesiados com a mistura na proporção 1:2 de anestésico cloridrato de quetamina, 100 mg/ml (Dopalen, da marca Vetbrands, Jacareí, Brasil) e relaxante muscular cloridrato de xilazina, 20 mg/ml (Anasedan, da marca Vetbrands, Jacareí, Brasil), respectivamente, na dosagem de 1 ml/kg. Aplicados de forma intramuscular, com seringa de 1 ml e agulha de 12,7 mm estéril acoplada.

A ligadura para a indução de doença periodontal foi constituída de fio 100 % algodão colocado na região cervical do primeiro molar inferior direito, tomando-se o cuidado em penetrar o fio no sulco

gingival. Portanto, em íntima proximidade aos tecidos gengivais, ficando o nó na região mesial, como feito por Rodini (2005) (Figura 2).

A doença periodontal induzida por ligadura foi iniciada sete dias antes da colocação do dispositivo ortodôntico, de acordo com o estudo que demonstrou perda de osso alveolar significativa após este período de indução da doença periodontal (Holzhausen et al., 2002), permanecendo até o final do experimento.



Figura 2 - Ligadura para a indução de doença periodontal (Rodini, 2005).

4.4 Instalação do dispositivo para a movimentação ortodôntica

Para a instalação do dispositivo ortodôntico, os animais foram novamente anestesiados e posicionados em uma mesa operatória modificada, idealizada por Houston (1964). Este procedimento foi executado por um único cirurgião experiente e treinado (MSJr). O dispositivo ortodôntico foi instalado sete dias após a indução da doença periodontal.

Foi utilizado o porta agulha Mathieu e afastando-se a mucosa jugal do rato com uma pinça clínica. Inicialmente, foi inserido por lingual e pelo espaço interproximal entre o primeiro e segundo molar direito, a ponta de um segmento de fio de amarrilho 0,15 mm. Neste amarrilho foi conectado uma mola de aço fechada de 4 mm de

comprimento. Para fixar a outra extremidade da mola, foi utilizado fio de amarrilho de 0,20 mm laçando sua ponta e fixando-a nos incisivos inferiores. Neste momento, a mola fechada se abre iniciando o tracionamento dental e gerando uma força de 75 cN, que é equivalente à 75 g. No primeiro molar inferior direito, tem-se o ponto de aplicação da força e os incisivos inferiores serviram como ponto de ancoragem, permitindo a mesialização do primeiro molar (Figura 3). Para finalizar, foi aplicada após condicionamento ácido, resina composta fotopolimerizável para evitar que ferimentos fossem causados nos animais.

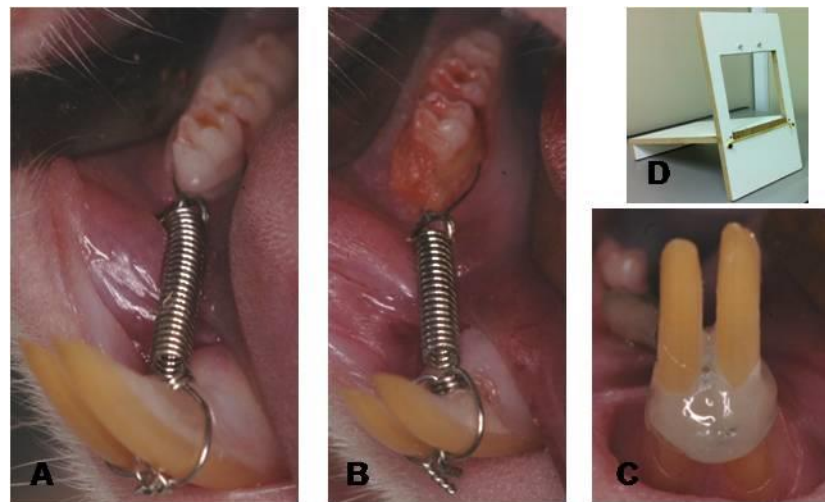


Figura 3 - Instalação do dispositivo ortodôntico (A). Dispositivo instalado juntamente com a ligadura (B). Aplicação de resina fotopolimerizável nos incisivos (C). Mesa operatória modificada (D).

4.5 Período experimental

Para o grupo fumante, o período experimental totalizou 75 dias. Aos 90 dias de idade e pesando em média 300g, os animais foram expostos à fumaça de cigarro por 60 dias, antes de qualquer intervenção, mantendo-se a exposição até o dia do sacrifício. A indução periodontal

ocorreu 61º dia e após sete dias foi instalado o dispositivo para movimentação ortodôntica. Para o grupo não fumante, os animais iniciaram o período experimental com a colocação da ligadura. Passado sete dias, instalou-se o dispositivo ortodôntico e, em mais sete dias, ocorreu o sacrifício (Quadro 2).

Quadro 2 - Linha do Tempo do Período Experimental de acordo com os grupos teste e controle

FUMANTES TESTE	Exposição à fumaça de cigarro			Indução da DP	Indução da MO	Sacrifício
	1º dia	8º dia	16º dia	61º dia	68º dia	75º dia
LINHA DO TEMPO						
CONTROLE NÃO FUMANTES	Indução da DP	Indução da MO	Sacrifício			

4.6 Preparo e análise histomorfométrica

Os animais foram anestesiados e sacrificados pela técnica de perfusão transcardíaca. Esta técnica consiste em abrir a cavidade torácica para expor o coração do animal, introduzir uma agulha acoplada a uma cânula no ventrículo esquerdo e, seccionar o átrio direito. Ligada a uma bomba que inicialmente impulsiona solução salina (cloreto de sódio a 0,9 %) com o objetivo de remover todo o sangue do animal e, logo após, solução fixadora constituída por paraformoldeído à 4 % em tampão fosfato, com pH 7,4, auxiliando na fixação imediata da peça.

Após a decapitação, as hemimandíbulas foram separadas, catalogadas e armazenadas em solução de paraformoldeído à 4 %, tamponado, permanecendo por 72 horas. Em seguida, foram

desmineralizadas em solução de EDTA 10 %, pH 7,8 e, incluídas em parafina. As secções foram obtidas (Microm HM 325) no sentido longitudinal para possibilitar a visualização das raízes e tecidos periodontais do primeiro molar inferior, com espessura de 5 µm e, coradas pelo método hematoxilina e eosina de Harris e Lison.

As análises microscópicas quantitativas realizadas foram: área da perda óssea na região de furca e densidade mineral óssea da mesma região, avaliadas em cortes histológicos semissequenciais.

4.7 Medida macroscópica: movimentação dentária (mm)

A medida da movimentação dentária foi feita após o sacrifício e compreende a somatória do diâmetro dos três molares inferiores e o espaço formado pela movimentação dentária, medindo-se da distal do 3º molar até a mesial do 1º molar. Para medida foi utilizado o paquímetro digital Mitutoyo Absolute Digimatic, modelo No. CD-6" CX-B (Suzano, Brasil), como apresentado abaixo (Figura 4).



Figura 4 - Mensuração da movimentação dentária.

4.8 Morfometria em microscopia convencional

As imagens dos cortes histológicos selecionados foram capturadas em aumento de 50x, utilizando o microscópio Axioplan 2 e o programa de aquisição de imagens Axiovision Rel 4.7. Antes de iniciar as medidas, as imagens foram renomeadas para o devido cegamento do examinador. As imagens foram analisadas pelo programa computacional Image J 1.49v, obtido por domínio público, <http://imagej.nih.gov/ij>.

4.8.1 Área da perda óssea (mm²)

A área da perda óssea medida equivale ao espaço ocupado pelo ligamento periodontal e perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior. Foram medidos 10 cortes semissequenciais dessa região em cada espécime e posteriormente, calculado a média para cada espécime. No image J, primeiramente foi feito a calibração da medida e o valor encontrado foi anotado e utilizado para todas as medidas (Figura 5).

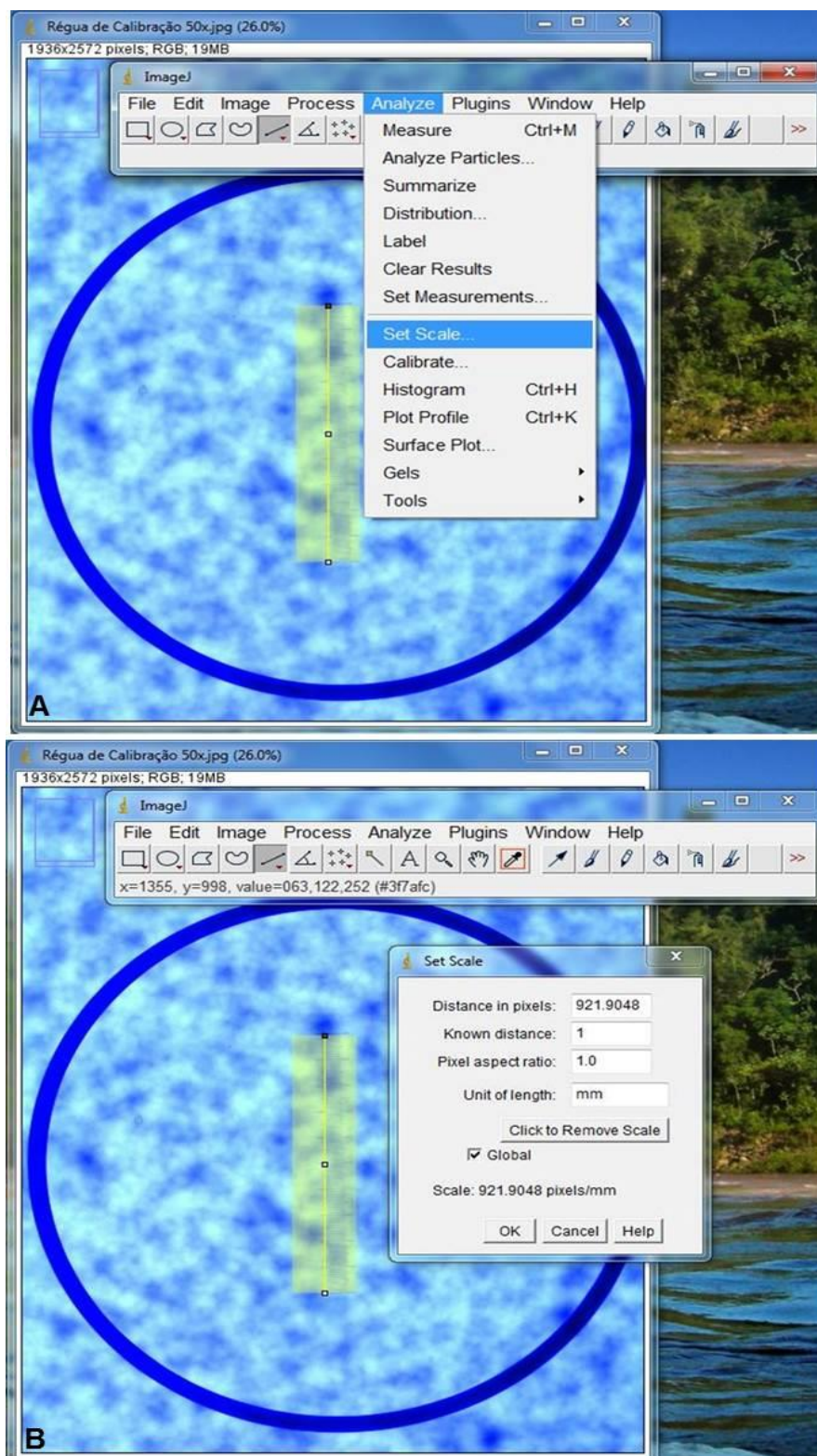


Figura 5 - Calibração da medida. A: Reprodução da distância conhecida na régua de 50x, utilizado a ferramenta "Straight". B: Inserindo a distância conhecida de 1 mm, na caixa "Set Scale"

Com a ferramenta “*Polygon selections*” a área de perda óssea em mm² foi demarcada, e mensurada em “*Analyze*”, “*Measure*” (Figura 6).

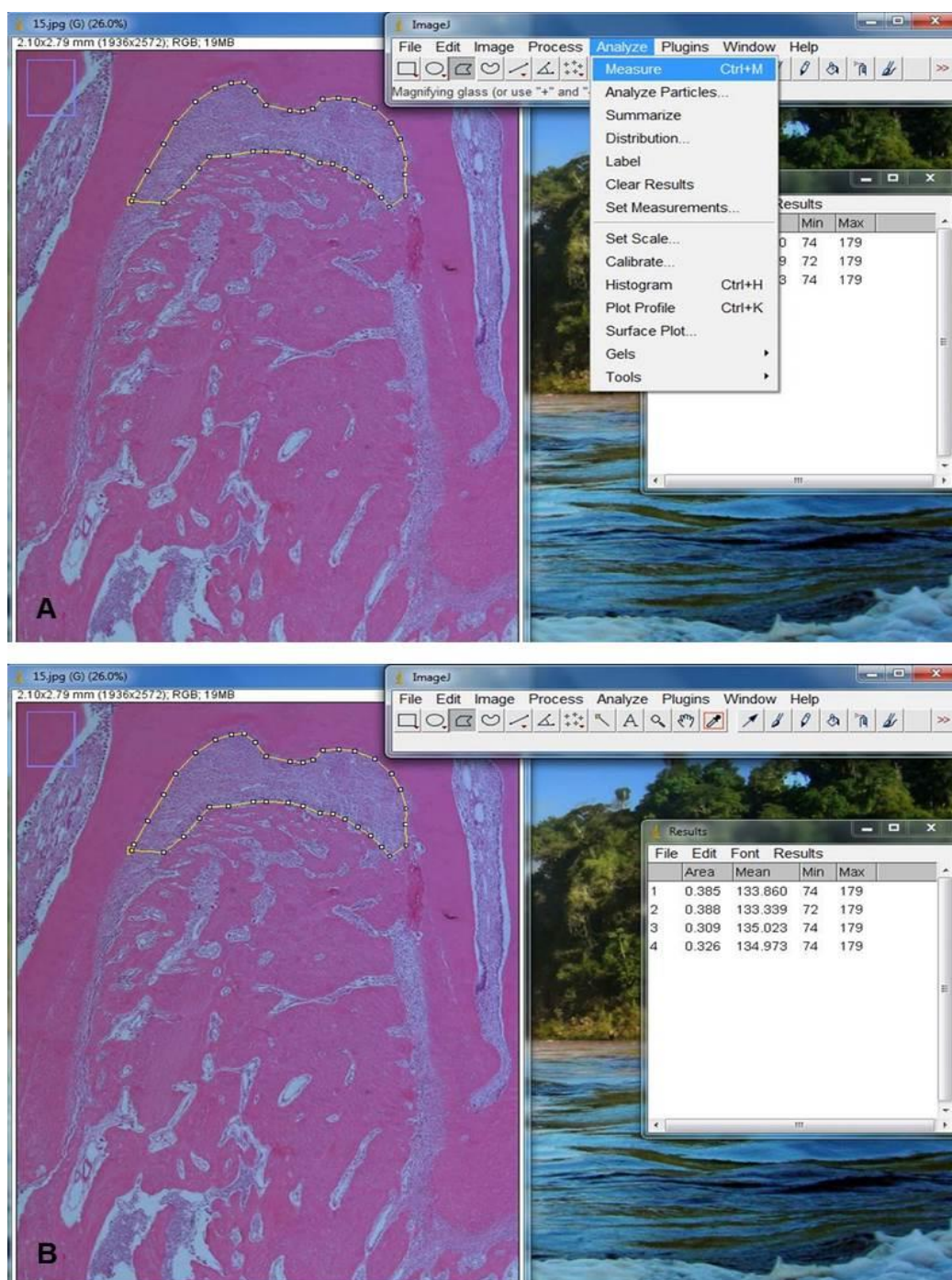


Figura 6 - Mensuração da área de furca. A: Demarcação da região avaliada. B: Resultado observado em cada imagem.

4.8.2 Densidade óssea (%)

Foi realizada a contagem pela marcação de pontos em 5 cortes por amostra, distantes em pelo menos 20 μm , avaliados quanto à qualidade óssea, isto é, proporção de tecido ósseo mineralizado em uma zona de 1.000 μm sob a crista óssea, na área interradicular dentária (Figura 7). Foi colocado um grid e com a ferramenta “*Straight*” delimitou-se altura e largura da região avaliada para facilitar a contagem dos pontos, sempre se baseando na crista óssea interradicular. A contagem foi feita na intersecção dos pontos onde havia tecido ósseo, utilizando a ferramenta “*Multi point*”. Depois, o valor obtido foi convertido para porcentagem pelo programa computacional Microsoft Excel 2010.

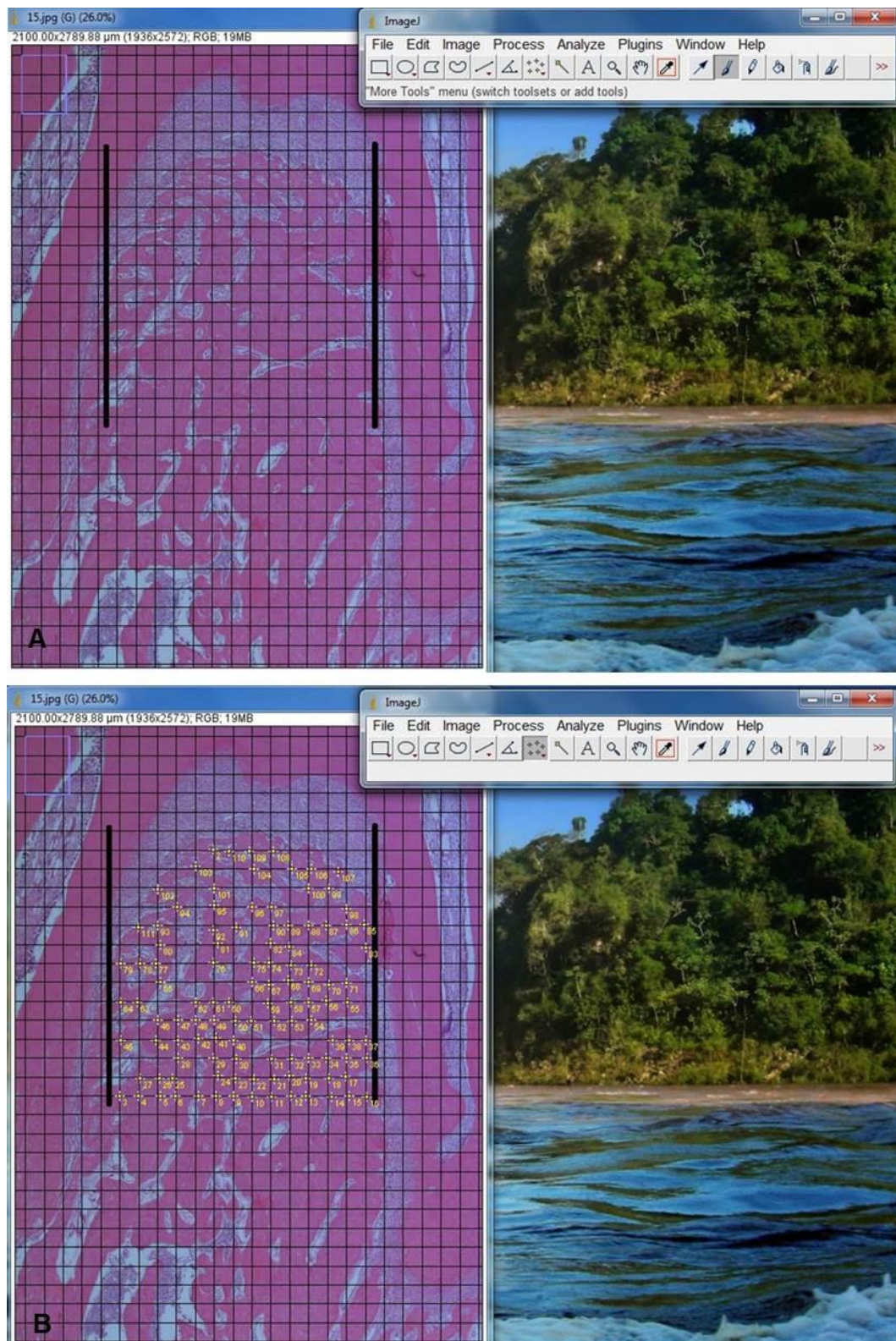


Figura 7 - Mensuração da densidade óssea. A: Delimitação da região avaliada. B: Marcação da intersecção dos pontos no tecido ósseo, em amarelo.

4.9 Análise estatística

Os dados foram coletados e tabulados. Foram calculados as médias e desvios-padrão para as condições fumante e não fumante nas seguintes situações: doença periodontal + movimentação ortodôntica (DP+O); doença periodontal (DP); movimentação ortodôntica (O) e controle (C+). Foram construídos histogramas para avaliar o comportamento das informações adquiridas. Para a análise estatística foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk e, teste de igualdade de variâncias. Foi utilizado o teste ANOVA de dois fatores com nível de significância de 0,05.

5 RESULTADOS

Foi realizada a medida macroscópica da movimentação dentária e, as medidas histomorfométricas, da área de perda óssea e da densidade mineral óssea, na região de furca do 1º molar inferior.

Na figura abaixo, temos as fotomicrografias da região de furca, ilustrando as características histológicas do controle positivo (C+), movimentação ortodôntica (O), doença periodontal (DP) e doença periodontal com movimentação ortodôntica (DP+O) para as condições: fumante e não fumante.

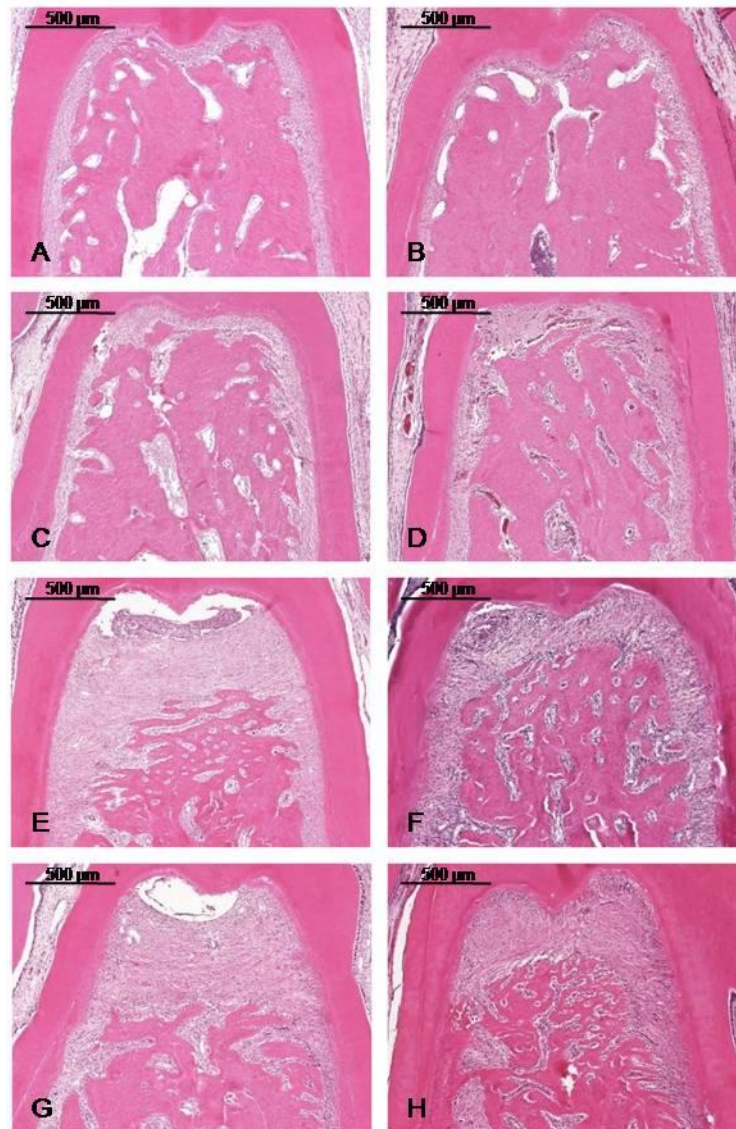


Figura 8 – Fotomicrografia da região de furca do 1º molar inferior para fumantes (coluna esquerda) e não fumantes (coluna direita). A e B: controle positivo. C e D: movimentação ortodôntica. E e F: doença periodontal. G e H: doença periodontal com movimentação ortodôntica. Coloração HE.

5.1 Movimentação dentária

A Tabela 1 contém as médias e os desvios-padrão. Houve diferença estatisticamente significativa em DP+O versus DP ($p=0,001$) e

DP+O versus C+ ($p=0,001$) para o grupo fumante. No grupo não fumante, também houve diferença nas mesmas condições e, em DP+O versus O, todos com $p<0,001$. Confirmando a realização da movimentação ortodôntica e a mobilidade dental causada pela doença periodontal (Figura 9).

Tabela 1 – Média e desvio-padrão para movimentação dentária

Condição	Fumante	Não Fumante
C+	6,995±0,190	6,884±0,161
O	7,115±0,188	7,044±0,215
DP	6,992±0,208	6,975±0,209
DP+O	7,325±0,228	7,499±0,404

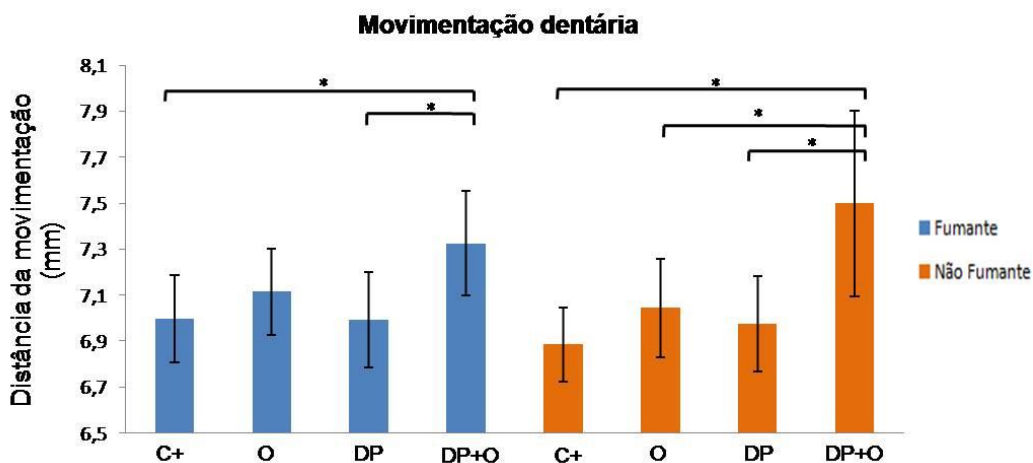


Figura 9 – Médias e desvios-padrão da movimentação dentária. C+: controle positivo, O; movimentação ortodôntica, DP: doença periodontal, DP+O; movimentação ortodôntica com doença periodontal, *: diferença estatística significativa.

5.2 Perda óssea

As médias e os desvios-padrão da perda óssea estão na Tabela 2. Houve diferença estatisticamente significativa entre DP+O versus C+, DP+O versus O, DP versus C+ e DP versus O, todos com $p < 0,001$. Com exceção, no grupo fumante, DP+O versus O com $p = 0,007$ e DP versus O com $p = 0,006$. Não houve diferença estatística entre O versus C+, confirmando que a movimentação ortodôntica não causa perda óssea. Também não houve diferença entre DP+O versus DP, sugerindo que, nos casos em que a movimentação ortodôntica seja realizada em um período de curta duração, esta não agravaria a perda óssea (Figura 10).

Tabela 2 – Média de desvio padrão da perda óssea

Condição	Fumante	Não Fumante
C+	0,199±0,349	0,098±0,022
O	0,338±0,379	0,171±0,07
DP	0,788±0,521	0,714±0,319
DP+O	0,788±0,589	0,858±0,325

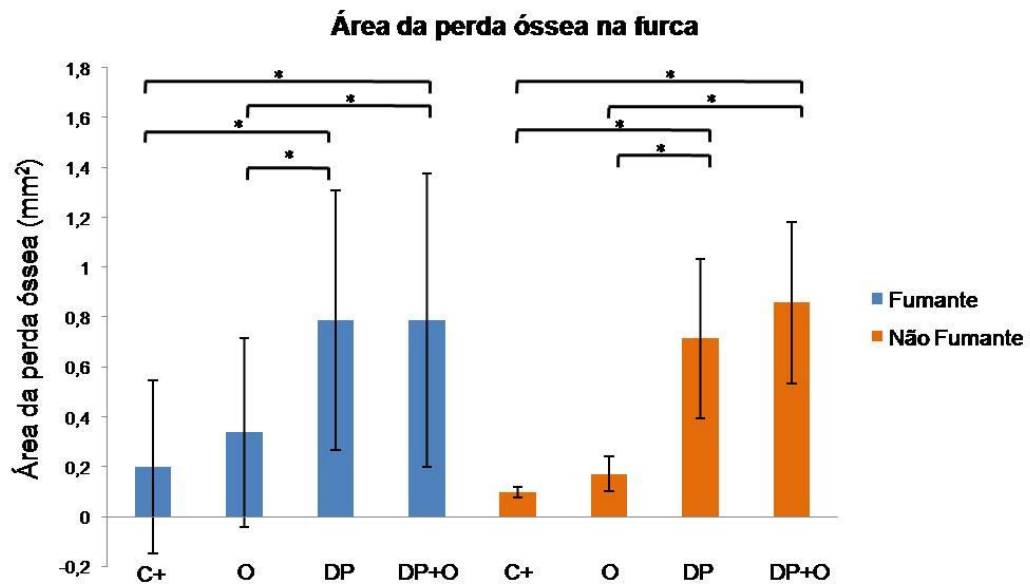


Figura 10 – Gráfico das médias e desvios-padrão para perda óssea na furca. C+: controle positivo, O; movimentação ortodôntica, DP: doença periodontal, DP+O; movimentação ortodôntica com doença periodontal, *: diferença estatística significativa.

5.3 Densidade óssea

As médias e desvios-padrão encontram-se na Tabela 3. No grupo fumante, houve diferença estatisticamente significativa para DP+O versus C+ ($p=0,027$) e DP versus C+ ($p=0,032$). No grupo não fumante, as diferenças estatisticamente significativas foram observadas nas mesmas condições, DP+O versus C+ ($p<0,001$), DP versus C+ ($p=0,010$) e, também, O versus C+ ($p=0,050$) (Figura 11).

Tabela 3 – Média e desvio-padrão para densidade óssea

Condição	Fumante	Não Fumante
C+	54,19±16,038	58,16±11,347
O	46,06±24,485	49,43±12,772
DP	44,62±18,087	47,17±15,963
DP+O	44,21±16,139	43,96±14,081

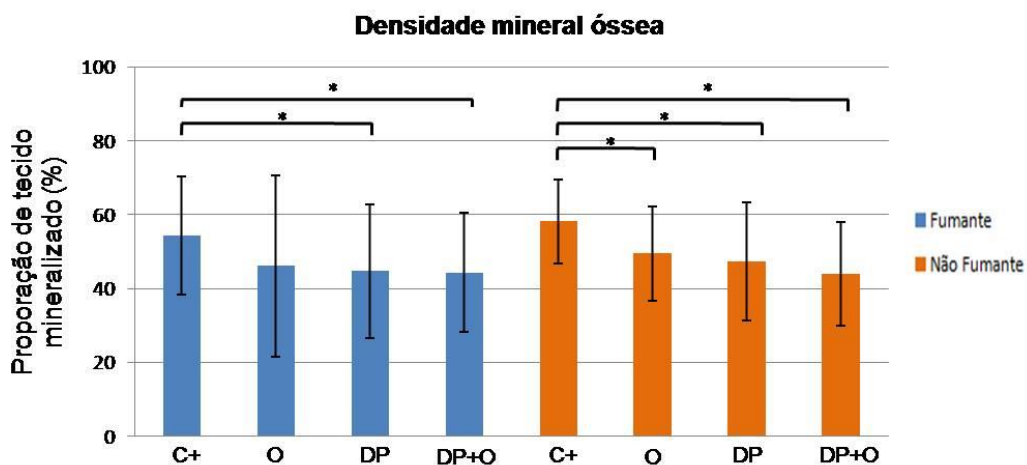


Figura 11 – Médias e desvios-padrão da proporção de tecido ósseo, 1000 μ m abaixo da crista óssea, na região de furca. C+: controle positivo, O; movimentação ortodôntica, DP: doença periodontal, DP+O; movimentação ortodôntica com doença periodontal, *: diferença estatística significativa.

6 DISCUSSÃO

Este estudo foi conduzido para elucidar o efeito concomitante da doença periodontal e da movimentação ortodôntica em ratos submetidos à inalação da fumaça de cigarro. Avaliou-se histomorfometricamente a perda óssea e a qualidade óssea na região de furca e, macroscopicamente, a movimentação dentária. Por meio dos modelos experimentais de ligadura, movimentação ortodôntica e inalação da fumaça de cigarro.

O tabagismo tem sido reconhecido com um dos principais fatores de risco para várias doenças em humanos, e está relacionado a uma proporção substancial de doenças mundiais (Ezzati et al., 2002). Tem sido estimado que o cigarro possua aproximadamente 5000 substâncias químicas nocivas, formando uma mistura complexa, dinâmica e reativa (Borgerding et al., 2005; Talhout et al., 2011). Estudos clínicos e epidemiológicos confirmam que o fumo é o maior fator de risco na doença periodontal, ocasionando perda de inserção, perda óssea, perda dental com poucos sinais de inflamação (Palmer et al., 2005) aumentando também a taxa de progressão da doença periodontal (Paulander et al., 2004; Airila-Mansson et al., 2005; Baljoon et al., 2005) e destruição periodontal (Cesar-Neto et al., 2004). O fumo exerce influência direta e a associação deste com o biofilme é mais destrutivo do que apenas um fator. O tabagismo crônico compromete a saúde periodontal (Bergstrom et al., 1991 e 2000), além de estar correlacionado com maior perda óssea marginal (Jansson, Lavstedt, 2002). Fumantes poderiam abrigar mais ou maior número de patógenos periodontais que não fumantes, sem aumentar a quantidade de placa (Palmer et al., 2005).

A influência da fumaça de cigarros sobre o metabolismo ósseo foi relatada por César-Neto et al. (2003) mostrando que a inalação da fumaça de cigarro tem uma maior influência, quando comparada com

injeções subcutâneas de nicotina, no reparo ósseo cortical e medular ao redor de implantes de titânio inseridos em tíbias de ratos. O regime de exposição à fumaça de cigarro utilizado promove níveis séricos de cotinina similares ao consumo de 10 a 20 cigarros/dia (Gonzalez et al., 1996). César- Neto et al. (2005, 2006) ao avaliarem histometricamente o osso alveolar de suporte, mostraram que além de influenciar negativamente o reparo ósseo, a fumaça de cigarro também promove uma diminuição na densidade do tecido ósseo que não sofreu nenhum tipo de lesão e está em função normal, e que esse efeito é revertido com a interrupção da exposição à fumaça.

Neste estudo, no grupo fumante, a média de perda óssea foi 0,788 mm² para a doença periodontal, 0,338 mm² para a movimentação ortodôntica e 0,199 mm² para o controle. Já no grupo não fumante, obteve-se média de 0,714, 0,171 e 0,098 mm² para DP, O e C+, respectivamente. Embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre fumante e não fumante, vale ressaltar que a média da perda óssea foi o dobro e alcança quase o dobro na movimentação ortodôntica no grupo fumante comparado com o grupo não fumante. Embora tenha sido feito a inalação de acordo com protocolo comprovado cientificamente, neste caso, não foi suficiente para haver uma significância entre os grupos. Por outro lado, pode-se pensar que o modelo empregado reproduziu uma condição de fumante leve à moderado ao invés de fumante pesado. As concentrações de 1,3 mg de nicotina, 16,5 mg de alcatrão e 15,2 mg de monóxido de carbono foi a descrita na literatura. No entanto, as concentrações utilizadas neste estudo foram: 0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão, 10 mg de monóxido de carbono, de acordo com as especificações do fabricante. Talvez, essa concentração menor possa ter causado este resultado, uma vez, que entre as variações de indivíduos que fumam, estão incluídas não somente a frequência e profundidade de inalação, como também o tamanho da

ponta de cigarro, presença ou ausência de filtro e a marca (Benowitz, 1996).

A cotinina, principal metabólito da nicotina, tem meia-vida plasmática entre 10 a 30 horas (Benowitz et al., 1983; Curvall, Enzell, 1986) e estabelece uma associação quantitativa direta entre o nível de fumar e a severidade da condição periodontal através do nível de inserção clínica, profundidade de sondagem e altura da crista óssea (González et al., 1996). A avaliação da cotinina no soro sanguíneo (de Weeder et al., 2002; Dhar, 2004). justifica o efeito dose-dependente sobre o tecido, ou seja, a influência do fumo depende do tempo de exposição (Bergstrom et al., 1991).

Shintcovisk et al (2014) avaliaram o efeito da nicotina no mecanismo de remodelação óssea durante a movimentação ortodôntica, e observaram redução na angiogênese, nos precursores de osteoclastos, na osteoclastogênese e nas lacunas de Howship, retardando o processo de maturação do colágeno no desenvolvimento da matriz óssea.

Já Okamoto et al. (2009) observaram que a periodontite experimental inibiu a movimentação ortodôntica e, a distribuição de osteoclastos no osso alveolar como resultado da aplicação da força ortodôntica sendo significativamente alterada na presença de periodontite. Diferentemente, em nosso estudo, ao avaliar a movimentação dentária encontramos diferenças significantes entre DP e DP+O, tanto em fumantes quanto não fumantes. No entanto, ao avaliar a perda óssea nestes mesmos grupos não houve diferença entre eles. Assim como, não houve diferença entre MO versus C+, confirmando que a movimentação ortodôntica não causou perda óssea na região de furca, onde não havia inflamação. Ericsson e Thilander (1978) demonstraram que a movimentação ortodôntica não é capaz de causar inflamação gengival em locais onde o periodonto de suporte esteja notavelmente reduzido e não inflamado. Também ilustraram que o fator mais importante para a

iniciação, progressão e recorrência da doença periodontal é a presença de biofilme subgengival.

A combinação de inflamação, movimento ortodôntico e trauma oclusal pode induzir mais rapidamente o desenvolvimento de profundidade de sondagem e perda óssea do que a ocorrida somente na presença da inflamação crônica (Klessner, 1976).

A perda óssea foi maior em DP+O comparado com C+ e O, em ambos os grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre DP e DP+O nos dois grupos, assim podemos inferir que a perda óssea que ocorreu pode estar mais associada com a própria doença periodontal do que ação da movimentação ortodôntica em si. Isso poderia ser justificado pela própria diferença estatisticamente significativa encontrada entre DP versus O e DP versus C+, para ambos os grupos. Quando uma força é aplicada adequadamente sobre a estrutura dental, os tecidos periodontais se adaptam à força gerada de forma a devolver o equilíbrio entre o dente e o periodonto (Heller, Nanda, 1979) e a movimentação ortodôntica não causa perda óssea. O fato de não ter sido encontrado diferença entre os DP+O e DP, pode ser devido à quantidade de força aplicada no dente com ligadura. Quando uma força excessiva é aplicada, o ligamento periodontal comprimido é esmagado, resultando em isquemia e hialinização, que retarda a movimentação. Quando uma força moderada é aplicada, o ligamento periodontal pode torna-se comprimido resultando no atraso da reabsorção óssea. Contudo, forças leves produzem somente uma parcial isquemia no ligamento periodontal junto com a reabsorção óssea direta, resultando em uma movimentação ortodôntica contínua (Cardaropoli, Gaveglio, 2007). O tempo de avaliação foi de 7 dias e, por isso, não é possível assegurar que alguma perda óssea não possa ocorrer acima desse período.

Considerando que no processo de remodelação óssea, o tecido ósseo renova-se por si mesmo e permanecem os componentes estruturais, as alterações vasculares e eventos celulares envolvidos na

remodelação podem ser relacionados com os efeitos do fumo na densidade óssea (Cesar Neto et al., 2006). Além disso, os papéis multifuncionais de RANK, OPG e RANKL podem fornecer um importante elo entre a remodelação óssea, movimentação ortodôntica, e reabsorção radicular e, outras condições locais e sistêmicas (Yamaguchi, 2009). No que diz respeito à formação de osteoclastos, os fibroblastos do ligamento periodontal desempenham dupla função significativa na remodelação óssea alveolar. Sob condições fisiológicas, podem sintetizar níveis mais elevados de OPG em comparação com RANKL, que tem um efeito inibidor sobre a osteoclastogênese. Quando o equilíbrio fisiológico é perturbado, seja sob a influência de forças mecânicas ou por desafio bacteriano (Kajiya et al., 2010), a produção de moléculas que estimulam a osteoclastogênese é aumentada, possivelmente levando a um aumento na formação de osteoclastos (Sokos et al., 2015).

Nagaie et al. (2014) concluíram que os componentes do fumo retardaram a movimentação ortodôntica em ratos, em parte, por causa da capacidade destes componentes inibirem a osteoclastogênese. Adicionalmente, seus resultados *in vitro* indicaram que o efeito inibidor parece estar voltado mais para os pré-osteoclastos do que os osteoblastos. Ainda, as secções histológicas avaliadas foram obtidas distantes da gengiva para eliminar a intervenção da periodontite, uma vez que essa poderia conduzir a erros de interpretação dos resultados, visto que tem se considerado os lipopolissacarídeos presente em bactérias Gram-negativas do biofilme dental, como potentes estimuladores para severa osteoclastogênese seguida por perda óssea (Kajiya et al., 2010). Ainda, ressalta que uma compreensão entre periodontite, tabagismo e a movimentação ortodôntica deve ser explorada. Como já citado, nossos resultados na perda óssea e na densidade óssea não diferiram entre DP e DP+O, sendo observada diferença somente na movimentação dentária.

A adequada combinação entre o tratamento ortodôntico e periodontal tem sido usado para melhorar as sequelas das doenças

periodontais, sugerindo possibilidade de sucesso em longo prazo (Ong, Wang, 2002; Cardaropoli, Gaveglia, 2007).

Dentro do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que investiga, *in vivo*, a combinação de doença periodontal e movimentação ortodôntica juntamente com a inalação da fumaça de cigarro, portanto, ser cauteloso com a interpretação dos dados é importante. No entanto, os resultados desta pesquisa são importantes porque evidenciam que forças ortodônticas aplicadas no periodonto sadio não induzem a destruição periodontal. Em sítios com doença periodontal associado ao biofilme e, que recebam forças ortodônticas adequadas, a perda óssea ocorrida pode ser mais resultante da doença periodontal do que da ortodontia em si.

É sabido que o estado de doença periodontal ativa é contraindicação para o tratamento ortodôntico (Wennström et al., 1993; Zachrisson, Alnaes, 1973), porém, nos casos em que a doença periodontal foi tratada e que recebem tratamento periodontal de suporte, o tratamento ortodôntico pode ser realizado, completando a reabilitação do caso (Melsen et al., 1988).

Outros estudos que explorem a relação da doença periodontal, movimentação ortodôntica e fumo em níveis celulares e moleculares devem ser realizados para compreendermos os mecanismos de atuação destes no tecido ósseo.

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo, concluímos que a inalação da fumaça de cigarro não teve influência nos grupos avaliados. Porém, a doença periodontal induzida, associada ou não a movimentação ortodôntica causou maior perda óssea em ambos os grupos.

8 REFERÊNCIAS*

Airila-Mansson S, Söder B, Klinge B. Bone height changes in individuals with periodontal disease: a 17-year prospective longitudinal study. *J Clin Periodontol*. 2005 Jul;32(7):822-7.

Alikhani M, Alyami B, Lee IS, Almoammar S, Vongthongleur T, Alansari S, et al. Saturation of the biological response to orthodontic forces and its effect on the rate of tooth movement. *Orthod Craniofac Res*. 2015 Apr;18 (Suppl 1):8-17. doi: 10.1111/ocr.12090

Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes Infect*. 2000 Aug;2(10):1181-92.

Baljoon M, Natto S, Bergström J. Long-term effect of smoking on vertical periodontal bone loss. *J Clin Periodontol*. 2005 Jul;32(7):789–97.

Benowitz NL. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev*. 1996;18(2):188-204.

Benowitz NL, Kuyt F, Jacob P 3rd, Jones RT, Osman AL. Cotinine disposition and effects. *Clin Pharmacol Ther*. 1983 Nov;34(5):604-11.

Bensch L, Braem M, Van Acker K, Willems G. Orthodontic treatment considerations in patients with diabetes mellitus. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2003 Jan;123(1):74-8.

Bergström J, Eliasson S, Dock J. A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health. *J Periodontol*. 2000 Aug;71(8):1338-47

Bergström J, Eliasson S, Preber H. Cigarette smoking and periodontal bone loss. *J Periodontol*. 1991 Apr;62(4):242-6.

Borgerding M, Hubert K. Analysis of complex mixtures–cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol*. 2005 Jul;57(Suppl 1):43-73.

*Baseado em: International Committee of Medical journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedicals Journal: Sample References [internet]. Bethesda: US NLM;c2003 [atualizado 20 ago 2013; acesso em 25 out 2014]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Cardaropoli D, Gaveglio L. The influence of orthodontic movement on periodontal tissues level. *Semin Orthod.* 2007 Dec;13(4):234-45.

Cendon SP, Battlehner C, Lorenzi-Filho G, Dohnnikoff M., Pereira PM, Conceição GMS, et al. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. *Braz J Med Biol Res.* 1997 Oct;30(10):1241-7.

César-Neto JB, de Souza, AP, Barbieri D, Moreno Junior H, Sallum E A, Nociti FH Jr. Matrix metalloproteinase-2 may be involved with increased bone loss associated with experimental periodontitis and smoking: a study in rats. *J. Periodontol.* 2004;75(7):995-1000.

César-Neto JB, Benatti BB, Manzi FR, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH. The influence of cigarette smoke inhalation on bone density. A radiographic study in rats. *Braz Oral Res.* 2005 Jan-Mar;19(1):47-51.

César-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH Jr. The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodontal Res.* 2006 Apr;41(2):118-23.

César-Neto JB, Duarte PM, Sallum EA, Barbieri D, Moreno H Jr, Nociti FH Jr. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *J Periodontol.* 2003 Oct;74(10):1454-9.

Curvall M, Enzell CR. Monitoring absorption by means of determination of nicotine and cotinine. *Arch Toxicol Suppl.* 1986;9:88-102.

Dhar P. Measuring tobacco smoke exposure: quantifying nicotine/cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay methods. *J Pharm Biomed Anal.* 2004 Apr 1;35(1):155-68.

de Weerd S, Thomas CM, Kuster JE, Cikot RJ, Steegers EA. Variation of serum and urine cotinine in passive and active smokers and applicability in preconceptional smoking cessation counseling. *Environ Res.* 2002 Oct; 90(2):119-24.

Ericsson I, Thilander B. Orthodontic forces and recurrence of periodontal disease. An experimental study in the dog. *Am J Orthod.* 1978 Jul;74(1):41-50

Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Vander Hoorn S, Murray CJ, Comparative Risk Assessment Collaborating Group. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet*. 2002 Nov 2;360(9343):1347-60.

Fischer BM, Voynow JA, Ghio AJ. COPD: balancing oxidants and antioxidants. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015 Feb 2;10:261-76. doi: 10.2147/COPD.S42414

Giorgetti AP, César Neto JB, Ruiz KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Cigarette smoke inhalation modulates gene expression in sites of bone healing: a study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Oct;110(4):447-52. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.02.029.

González YM, De Nardin A, Grossi SG, Machtei EE, Genco RJ, De Nardin E. Serum cotinine levels, smoking, and periodontal attachment loss. *J Dent Res*. 1996 Feb;75(2):796-802.

Hapidin H, Othman F, Soelaiman IN, Shuid AN, Luke DA, Mohamed N. Negative effects of nicotine on bone-resorbing cytokines and bone histomorphometric parameters in male rats. *J Bone Miner Metab*. 2007;25(2):93-8.

Heller IJ, Nanda R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod*. 1979 Mar;75(3):239-58.

Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J Immunol Res*. 2015;2015:615486. doi: 10.1155/2015/615486.

Holzhausen M, Rossa Júnior C, Marcantonio Júnior E, Nassar PO, Spolidório DM, Spolidório LC. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2002 Sep;73(9):1030-6.

Houston WJ. A new design of rat mouth prop. *J Dent Res*. 1964 May-Jun;43:458.

Ishikawa I. Host responses in periodontal diseases: a preview. *Periodontol* 2000. 2007;43:9-13.

Jansson L, Lavstedt S. Influence of smoking on marginal bone loss and tooth loss—a prospective study over 20years. *J Clin Periodontol*. 2002 Aug;29(8):750–6.

Kajiya M, Giro G, Taubman MA, Han X, Mayer MP, Kawai T. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *J Oral Microbiol.* 2010 Nov 8; 2. doi: 10.3402/jom.v2i0.5532

Klessler M. Interrelations between orthodontics and periodontics. *Am J Orthod.* 1976 Aug;70(2):154-72

Lara VS, Figueiredo F, da Silva TA, Cunha FQ. Dentin-induced in vivo inflammatory response and in vitro activation of murine macrophages. *J Dent Res.* 2003 Jun;82(6):460-5.

Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res.* 2012 Feb;91(2):142-9. doi: 10.1177/0022034511421200

Le Mesurier SM, Stewart BW, Lykke AW. Injury to type-2 pneumocytes in rats exposed to cigarette smoke. *Environ Res.* 1981 Feb;24(1):207-17

Melsen B, Agerbaek N, Erikson J, Terp S. New attachment through periodontal treatment and orthodontic intrusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1988 Aug;94(2):104-16.

Nagaie M, Nishiura A, Honda Y, Fujiwara S, Matsumoto N. A comprehensive mixture of tobacco smoke components retards orthodontic tooth movement via the inhibition of osteoclastogenesis in a rat model. *Int J Mol Sci.* 2014 Oct;15(10):18610-22.

Nociti FH Jr, César NJ, Carvalho MD, Sallum EA. Bone density around titanium implants may be influenced by intermittent cigarette smoke inhalation: a histometric study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002 May-Jun;17(3):347-52.

Nociti FH Jr, Nogueira-Filho GR, Tramontina VA, Machado MAN, Barros SP, Sallum EA, et al. Histometric evaluation of the effect of nicotine administration on periodontal breakdown: an in vivo study. *J Periodontal Res.* 2001 Dec;36(6):361-6.

Ong MMA, Wang H. Periodontic and orthodontic treatment in adults. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2002 Oct;122(4):420-8

Ogawa T, Ishii N, Toda K, Soma K. Changes in response properties of periodontal mechanoreceptors during tooth movement in rats. *J Med Dent Sci.* 2002 Sep;49(3):95-101.

Okamoto A, Ohnishi T, Bandow K, Kakimoto K, Chiba N, Maeda A, et al. Reduction of orthodontic tooth movement by experimentally induced periodontal inflammation in mice. *Eur J Oral Sci.* 2009 Jun;117(3):238–47. doi: 10.1111/j.1600-0722.2009.00625.x.

Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors-tobacco smoking. *J Clin Periodontol.* 2005;32 (Suppl 6):180-95.

Paulander J, Axelsson P, Lindhe J, Wennström JL. Intra-oral pattern of tooth and periodontal bone loss between the age of 50 and 60 years. A longitudinal prospective study. *Acta Odontol Scand.* 2004 Aug;62(4):214-22.

Pavone C, Nogueira AV, de Oliveira GJ, Scardueli CR, Cerri PS, Marcantonio E, et al. Treatment of periodontal disease with an Er,Cr:YSGG laser in rats exposed to cigarette smoke inhalation. *Lasers Med Sci.* 2015 Nov;30(8):2095-103. doi: 10.1007/s10103-015-1731-8.

Perinetti G, Paolantonio M, D'Attilio M, D'Archivio D, Tripodi D, Femminella B, et al. Alkaline phosphatase activity in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2002 Nov;122(5):548-56.

Ren Y, Jongsma MA, Mei J, van der Mei HC, Busscher HJ. Orthodontic treatment with fixed appliances and biofilm formation – a potencial public health threat? *Clin Oral Investig.* 2014 Sep;18(7):1771-8. doi: 10.1007/s00784-014-1240-3.

Rodini CO. Doença periodontal inflamatório induzida por ligadura: caracterização microscópica e estudo da presença de mastócitos e das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e metaloproteinases -2 e -9 [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru USP – Univ de São Paulo; 2005.

Rothem DE, Rothem L, Soudry M, Dahan A, Eliakim R. Nicotine modulates bone metabolism-associated gene expression in osteoblast cells. *J Bone Miner Metab.* 2009;27(5):555-61. doi: 10.1007/s00774-009-0075-5

Samet JM, Wipfli HL. Globe still in grip of addiction. *Nature.* 2010 Feb;463(7284):1020-1. doi: 10.1038/4631020a.

Santamaria Junior M. *Biologia da movimentação dentária induzida e das reabsorções radiculares associadas: influência do gênero e dos bisfosfonatos*. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru USP - Univ de São Paulo; 2009.

Sella RC, Mendonça MR, Cuoghi OA, An TL. Histomorfometric evaluation of periodontal compression and tension sides during orthodontic tooth movement in rats. *Dental Press J Orthod*. 2012 May-Jun;17(3):108-17. doi: 10.1590/S2176-94512012000300021.

Shintcovsk RL, Knop L, Tanaka OM, Maruo H. Nicotine effect on bone remodeling during orthodontic tooth movement: histological study in rats. *Dental Press J Orthod*. 2014 Mar-Apr;19(2):96-107.

Smith CJ, Fischer TH. Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2001 Oct;158(2):257-67.

Sodagar A, Donyavi Z, Arab S, Kharrazifard MJ. Effect of nicotine on orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011 Mar;139(3):e261-5. doi: 10.1016/j.ajodo.2010.08.018.

Sokos D, Everts V, de Vries TJ. Role of periodontal ligament fibroblasts in osteoclastogenesis: a review. *J Periodontal Res*. 2015 Apr;50(2):152-9.

Susin C, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss attributable to cigarette smoking in a urban Brazilian population. *J Clin Periodontol*. 2004 Nov;31(11):951-8.

Talhout R, Schulz T, Florek E, Van Benthem J, Wester P, Opperhuizen A. Hazardous compounds in tobacco smoke. *Int J Environ Res Public Health*. 2011 Feb;8(2):613-28. doi: 10.3390/ijerph8020613.

Toms A, Gannon B, Carati C. The immunohistochemical response of the rat periodontal ligament endothelium to an inflammatory stimulus. *Aust Orthod J*. 2000 Jul;16(2):61-8.

Tønder KJ. Vascular reactions in the dental pulp during inflammation. *Acta Odontol Scand*. 1983 Aug;41(4):247-56.

Wennström JL, Stokland BL, Nyman S, Thilander B. Periodontal tissue response to orthodontic movement of teeth with infrabony pockets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1993 Apr;103(4):313-9.

Yamaguchi M. RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res.* 2009 May;12(2):113-9. doi: 10.1111/j.1601-6343.2009.01444.x.

Yuhara S, Kasagi S, Inoue A, Otsuka E, Hirose S, Hagiwara H. Effects of nicotine on cultured cells suggest that it can influence the formation and resorption of bone. *Eur J Pharmacol.* 1999 Nov;383(3):387-93.

Zachrisson BU, Alnaes L. Periodontal condition in orthodontically treated and untreated individuals I. Loss of attachment, gingival pocket depth and clinical crown height. *Angle Orthod.* 1973 Oct;43(4):402-11.

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética e Pesquisa com Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
 Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
 CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028
 Fax (12) 3947-9010 / tango@fosjc.unesp.br



CERTIFICADO
CEUA - Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 1/2014-PA/CEP, sobre
“Avaliação histológica e imunoistoquímica das reações
periodontais provocadas pela movimentação dentária associada à
doença periodontal. Estudos em ratos”, sob a responsabilidade de
MARIA APARECIDA NEVES JARDINI, está de acordo com os
 Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Conselho
 Nacional de Experimentação Animal – CONCEA e Lei Arouca nº 11.794
 de 08/10/2008 e foi aprovado por esta CEUA.

São José dos Campos, 14 de março de 2014.

Prof.Assist.Dr. RUBENS NISIE TANGO
Coordenador

Obs:- Para este trabalho serão utilizados 100 ratos (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar), sendo 90 para o projeto e 10 para perdas que ocorrerem.

Recebi o original deste documento. em 24/03/2014 Ass.: Maria Aparecida Neves Jardim
