



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



ANDRESSA VILAS BOAS NOGUEIRA

**EFEITO DA MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA NA
PROGRESSÃO DA DOENÇA PERIODONTAL
INDUZIDA EM RATOS**

ARARAQUARA

2010



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



ANDRESSA VILAS BOAS NOGUEIRA

**EFEITO DA MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA NA
PROGRESSÃO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM
RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para o título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

ARARAQUARA

2010

Nogueira, Andressa Vilas Boas

Efeito da movimentação ortodôntica na progressão da doença periodontal induzida em ratos / Andressa Vilas Boas Nogueira.– Araraquara: [s.n.], 2010.

94 f. ; 30 cm.

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

Orientador : Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

1. Movimentação dentária 2. Doenças periodontais 3. Óxido nítrico 4.
Citocinas I. Título

ANDRESSA VILAS BOAS NOGUEIRA

**EFEITO DA MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA NA
PROGRESSÃO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM
RATOS**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

2º Examinador: Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior

3º Examinador: Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza

Araraquara, 29 de março de 2010.

DADOS CURRICULARES

ANDRESSA VILAS BOAS NOGUEIRA

| | |
|------------|--|
| NASCIMENTO | 23 de Fevereiro de 1983 – Pouso Alegre, MG, Brasil |
| FILIAÇÃO | Reginaldo Pereira Nogueira Gissélida Vilas Boas Nogueira |
| 2003-2006 | Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. |
| 2007-2008 | Curso de Especialização em Periodontia pela Associação Paulista dos Cirurgiões-Dentistas e Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. |
| 2008-2010 | Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. |

"Enquanto suspiramos por uma vida sem dificuldades, devemos nos lembrar que o carvalho cresce forte através de ventos contrários e que os diamantes são formados sob pressão."

Peter Marshall

DEDICATÓRIA

A DEUS, pela força em todos os momentos difíceis e também pelos momentos de alegria e conquistas.

À minha mãe Gissélida Vilas Boas Nogueira, que por obra do destino enfrenta uma luta diária contra solidão e ainda tem força sobrenatural para me animar a seguir carreira acadêmica e me incentivar a nunca desanimar.

Ao meu Irmão William Kelvin Vilas Boas Nogueira pela racionalidade diante de todas as decisões familiares e exemplo de dedicação ao trabalho, à lei e à ética.

Ao Leonardo Tobal Berssaneti, pela companhia diária e participação intensa nos bastidores desse trabalho, ainda que como analista leigo.

Em especial ao meu motivador e saudoso pai, Reginaldo Pereira Nogueira, que com certeza se orgulha de mim, torce por mim e me acompanha aonde quer que eu vá!

AGRADECIMENTOS

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla e de sua vice-diretora Profa. Dra. Andrea Affonso Barreto Montandon.

Ao coordenador do curso de Pós-Graduação e orientador desse trabalho, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli pelo auxílio em meu desenvolvimento científico e desprendimento que colaboram para elevar o nível de nossa pós-graduação.

Aos Professores da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara: Carlos Rossa Júnior, Elcio Marcantonio Júnior, Joni Augusto Cirelli, José Eduardo César Sampaio, Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio e Silvana Regina Perez Orrico, pela formação e orientação.

Aos demais professores desta Faculdade e àqueles que lecionaram durante o curso de Pós-Graduação.

A todos os funcionários da Faculdade, em especial:

- da Disciplina de Periodontia: Claudinha, Regina Lúcia, Maria do Rosário, Zezé, Ester, Toninho e Thelma, sempre dispostos a nos ajudar. Obrigada pela amizade e prestatividade.

- da Biblioteca: Marley, Adriano, Ceres, Eliane e Sílvia, pela colaboração.

- da Seção de Pós-Graduação: Alexandre, Flávia, Mara e Rosângela, pela organização e cooperação.

- da Disciplina de Radiologia: Edineide, pela disponibilidade e ajuda.

À Claudinha (Ana Cláudia Miranda) pela amizade, paciência, dedicação e colaboração no processamento histológico.

À Regina Lúcia pela competência no trabalho, paciência e por estar sempre disposta a ajudar.

Aos amigos João, André, Rubão, Guilherme, Lucas, Rodrigo, Rafael Faeda, Humberto pela amizade, aprendizado e convívio diário!

Às amigas Chaíne, Shelon, Telma, Sabrina Frasnelli, Sâmia, Michele, pelo incentivo, risadas, companheirismo e aprendizado.

Merece agradecimento especial o mestrando e amigo João Antônio Chaves de Souza pelas muitas horas de dedicação a esse trabalho, no qual teve participação brilhante do início ao fim. E, também, pelos momentos de descontração e aprendizado vividos no biotério/laboratório que facilitaram a longa jornada desse trabalho!

Ao Fábio por ajudar na realização da análise protéica através do *Western blot*.

Aos demais companheiros de curso de Pós-Graduação: Yeon, Alliny, Fábio, Sabrina Aquino, Morgana, Leila, Lívia, Mariana, Ana Lúcia, Roberta, Wagner, Andres e Gabriela pela transferência de conhecimentos e experiências.

À CAPES e à FAPESP (Processos números 2008/02506-0, 2008/06328-0) pelo apoio financeiro necessário a realização do trabalho!

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------|----|
| Resumo..... | 11 |
| Abstract..... | 14 |
| INTRODUÇÃO..... | 17 |
| REVISÃO DE LITERATURA..... | 21 |
| PROPOSIÇÃO..... | 32 |
| MATERIAL E MÉTODO..... | 34 |
| RESULTADO..... | 50 |
| DISCUSSÃO..... | 66 |
| CONCLUSÃO..... | 75 |
| REFERÊNCIAS..... | 77 |
| ANEXOS..... | 93 |

RESUMO

Nogueira AVB. Efeito da movimentação ortodôntica na progressão da doença periodontal induzida em ratos. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

Resumo

O movimento ortodôntico ocorre por meio da remodelação dos tecidos periodontais em resposta à aplicação de uma força mecânica, sendo que vários mediadores químicos são sintetizados e liberados para seu início e manutenção. Dentre esses mediadores, o óxido nítrico (NO) atua como modulador da atividade de osteoclastos e osteoblastos na remodelação óssea. Interleucina-1 β (IL-1- β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) estimulam a reabsorção óssea e encontram-se aumentados no movimento ortodôntico. Estes mesmos mediadores também encontram-se aumentados e participam da destruição tecidual na doença periodontal. O objetivo deste estudo é avaliar *in vivo* a expressão de IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO sintase constitutiva endotelial (ecNOS), e NO sintase indutível (iNOS) nos tecidos periodontais de dentes sob movimentação ortodôntica em condições de saúde e doença periodontal, correlacionando-as às alterações histomorfométricas nesses tecidos. Para isso, 88 ratos foram divididos nos grupos: 1-controle (CONTR), 2-doença periodontal experimental induzida por ligaduras (DP), 3- movimento ortodôntico (MO), 4- doença periodontal experimental induzida por ligaduras, seguido de movimento ortodôntico (MODP). Biópsias dos tecidos gengivais ao redor

dos primeiros molares foram removidas para análise da expressão protéica e de mRNA, respectivamente, por *Western blot* e RT-PCR em tempo real. Cortes histológicos foram obtidos para avaliação histomorfométrica da perda óssea alveolar. Análise estatística foi realizada através do one-way ANOVA e a comparação entre os grupos foi feita com o teste de Tukey (nível de significância de 5%). Resultado: Máxima expressão gênica de todas as proteínas avaliadas foi observada no grupo MODP, nos períodos de 3h (eNos) ou de 1 dia (citocinas e iNOS) ($p < 0.05$). Também no dia 1, todas as proteínas foram expressas em níveis elevados para todos os grupos se comparados ao Controle. No período de 7 dias, houve tendência de redução de todas as proteínas para níveis basais, exceto a IL-6 que ainda encontrava-se com níveis elevados nos grupos MODP e MO. A histometria das regiões interproximal e de furca demonstraram que os grupos DP e MODP apresentavam mais perda óssea comparado aos outros grupos em todos os períodos ($p < 0.05$). Além disso, houve uma tendência do grupo MODP apresentar mais perda óssea que o DP na região distal. Conclusão: Uma vez que todas as moléculas avaliadas apresentam um importante papel no processo de reabsorção óssea, os resultados sugerem que quando a DP está presente durante o MO, os tecidos periodontais se tornam mais susceptíveis ao dano.

Palavras-chave: Movimentação ortodôntica; doenças periodontais; óxido nítrico; citocinas.

ABSTRACT

Nogueira AVB. Orthodontic movement effect on the progression of induced periodontal disease in rats. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

Abstract

Orthodontic tooth movement (OTM) occurs in response to mechanical forces through periodontal tissues remodeling. Several chemical mediators are synthesized and released for the beginning and maintenance of tissue remodeling. Among these mediators, nitric oxide (NO) acts as modulator of osteoclasts and osteoblasts activities in bone turnover. Interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) stimulate bone resorption and are increased in orthodontic movement. These same signaling molecules are also increased and play an important role on tissue destruction in periodontal disease. Objectives: The aim of this study was to assess in vivo the expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO synthase constitutive endothelial (ecNOS), and inducible NO synthase (iNOS) in dental tissues during orthodontic tooth movement in rats suffering from ligature-induced periodontal disease or in periodontally health animals. Cytokines expressions were correlated to histomorphometric changes on alveolar bone and other periodontal tissues. Methods: Eighty-eight rats were divided into four groups: 1- negative control (sham operated), 2 - ligature-induced periodontal disease (PD), 3 - orthodontic movement (OM), 4 - ligature-induced periodontal disease, followed by orthodontic movement (OMPD). Biopsies of gingival tissue around the first molars were removed for protein and

mRNA expression analysis, respectively by, Western blot and Real Time RT-PCR. Histologic tissue sections were obtained for histomorphometric evaluation of alveolar bone loss. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA and Tukey's post-hoc tests for all parameters (5% significance level). Results: Maximum mRNA expression of all evaluated proteins was observed in the OMPD group, on 3h (eNos) or day 1 (citokines and iNos) periods ($p < 0.05$). Also on day 1, all proteins were expressed in high levels for all groups compared to Control. On day 7, all protein levels tended to decrease to baseline levels, except IL-6 that was still increased in OMDP and OM groups. Data analysis of the interproximal and furcation regions demonstrated that the PD and OMPD groups presented more bone loss compared to the other groups in all periods ($p < 0.05$). In addition, the OMPD group tended to present more bone loss than the PD at the distal region. Conclusion: Since all evaluated molecules play an important role in the bone resorption process, the results suggest that when PD is present during OM, periodontal tissues are more susceptible to damage.

Key-words: Tooth movement; periodontal diseases; nitric oxide; cytokines.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

É inegável a crescente procura por tratamento ortodôntico nos dias atuais, em virtude da exacerbada necessidade estética e funcional, além da busca por melhoria na qualidade de vida. Esse aumento na demanda se dá sobretudo dentre o público adulto, no qual a indicação por este tipo de tratamento tem aumentado⁹⁰. No entanto, pacientes adultos merecem atenção especial por parte dos profissionais devido a várias limitações como maior prevalência de doença periodontal com conseqüente periodonto reduzido, perdas dentárias e migrações patológicas. Porém, mesmo diante dessas limitações, o tratamento ortodôntico apresenta bons resultados e vem sendo indicado porque trás consigo melhorias estéticas e funcionais, além de facilitar a higienização e o controle de placa e, com isso, manutenção da saúde periodontal⁹.

Recentemente, muitos estudos têm sido realizados para se conhecer os efeitos do movimento ortodôntico nos tecidos periodontais. Sabe-se que os tecidos submetidos à carga mecânica ortodôntica sofrem alterações resultantes de eventos biológicos complexos, uma vez que inúmeras moléculas, dentre elas citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico, RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B) e OPG (osteoprotegerina), são liberadas para estimular ou inibir a formação e/ou reabsorção óssea^{22,35,62}. Porém, ainda não foi elucidado o que ocorre quando a movimentação ortodôntica é realizada em dentição com doença periodontal presente.

Acredita-se que na presença da doença periodontal as moléculas liberadas no movimento ortodôntico atuem exacerbando os efeitos da doença periodontal, como inflamação e perda de inserção, podendo levar à perda do elemento dental. Portanto, a movimentação ortodôntica exige ausência de processo inflamatório e infeccioso no periodonto e adequado controle de placa bacteriana^{29,105}, principalmente em pacientes com história de doença periodontal prévia. Assim, mesmo nestes pacientes, os dentes podem ser movimentados sem que haja perda adicional de inserção e com possibilidade de ganho de inserção periodontal, desde que haja saúde periodontal^{16,75}.

Alguns estudos experimentais que avaliam a movimentação ortodôntica na presença de doença periodontal relatam que o movimento ortodôntico por si só não promove seqüelas ou lesões nos tecidos de inserção e não é capaz de induzir a progressão de um quadro de gengivite para doença periodontal destrutiva^{80,104}. Já, outros trabalhos relatam que quando essas condições encontram-se associadas, a perda de inserção pode ocorrer de forma mais acelerada^{31,83} e, somente com a manutenção da saúde periodontal é que movimentos ortodônticos podem ser realizados^{16,19,75}.

Portanto, faltam ainda estudos que evidenciem as reais mudanças dos mecanismos celulares e moleculares associados às características histomorfométricas durante o movimento ortodôntico de dentes comprometidos periodontalmente. Esses estudos são importantes, pois proporcionam um melhor embasamento científico para

o planejamento e realização dos tratamentos ortodôntico e periodontal, assim como, para que o paciente entenda a importância da indicação desses tratamentos.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

Mecanismos da Movimentação Ortodôntica

O movimento ortodôntico ocorre em virtude da remodelação dos tecidos periodontais, em resposta à aplicação de uma força mecânica, no qual há resposta concomitante das células e da matriz extracelular do ligamento periodontal (LP) e osso alveolar (Krishnan, Davidovitch⁶² 2006). As células ósseas reconhecem a aplicação da carga mecânica gerando uma remodelação óssea coordenada que consiste na reabsorção óssea adjacente a áreas de compressão do ligamento periodontal e neoformação óssea adjacente a áreas de tensão do ligamento periodontal, com subseqüentes alterações adaptativas do ligamento (Keles et al.⁵¹ 2007).

Krishnan, Davidovitch⁶² (2006) relatam que durante as fases iniciais do movimento dentário a aplicação de força gera uma inflamação aguda, na qual há fluxo contínuo de fluidos no ligamento periodontal e no tecido ósseo, que levam à distorção de células e matriz. Em virtude da ausência de invasão bacteriana essa reação é considerada como uma reação inflamatória asséptica, que envolve uma complexa resposta celular e é reintroduzida a cada ativação do aparelho. Como consequência, ocorre a liberação de ácido aracdônico das superfícies celulares e seu metabolismo, através da via lipoxigenase ou cicloxigenase, levam a liberação de primeiros mensageiros (prostaglandinas e leucotrienos), que ativam ou estimulam a

liberação dos segundos mensageiros (AMP cíclico, por exemplo). Esses segundos mensageiros provocam reações celulares, levando à remodelação do osso e do ligamento periodontal. Além disso ocorre intensa angiogênese e remodelação dos vasos sanguíneos pré-existentes, através dos quais ocorre a liberação de mediadores inflamatórios. Portanto, a síntese e liberação local de diversos mediadores químicos, destacando-se interleucina-1 alfa (IL-1 α), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e óxido nítrico (NO), desempenham importante papel no início e manutenção do processo de remodelação óssea, resultando no efeito clínico de movimento dentário (Bletsa et al.⁸ 2006, Davidovitch et al.²² 1988, Krishnan, Davidovitch⁶²⁻⁶³ 2006, 2009, Ren et al.⁸⁴ 2002).

Esses mediadores químicos são produzidos como resultado da mecanotransdução que é um processo no qual as células convertem a energia mecânica em sinais bioquímicos e/ou elétricos (Burger, Klein-Nulend¹³ 1999). Dessa forma, quando uma força ortodôntica é aplicada nos tecidos, ocorre uma movimentação do fluido intersticial na rede lacuno-canalicular do tecido ósseo – processo de adaptação mecânica do osso - e as células ósseas, principalmente os osteócitos (Akin et al.¹ 2004, Klein-Nulend et al.⁵⁷ 1995) que são células susceptíveis ao fluxo de fluido, convertem a energia mecânica em química através da produção de moléculas sinalizadoras, como o NO e prostaglandinas (Burger, Klein-Nulend¹³ 1999). Tem sido sugerido que tanto os osteócitos como a porosidade lacuno-canalicular são os sítios de mecanotransdução do tecido ósseo e aquelas moléculas

sinalizadoras são responsáveis pelo recrutamento de osteoblastos e osteoclastos, resultando no controle da remodelação óssea.

Resumindo, as moléculas de adesão celular (integrinas), juntamente com as outras vias de transdução, produzem mediadores químicos e ativam várias células que terão papel importante na indução da remodelação tecidual (Henneman et al.⁴⁵ 2008, Klein-Nulend et al.⁵⁷ 1995, Krishnan, Davidovitch⁶³ 2009). Portanto, células e tecidos utilizam mecanosensibilidade e mecanotransdução em resposta à aplicação de carga mecânica, com subsequente movimento do dente.

Estudos recentes têm proposto que o NO é uma molécula sinalizadora de mecanotransdução durante o estágio inicial do movimento ortodôntico (Akin et al.¹ 2004, D'Atillio et al.²⁰ 2004, Hayashi et al.⁴³ 2002, Shirazi et al.⁹¹ 2002, Yoo et al.¹⁰⁷ 2004), atuando como moduladora da atividade de osteoblastos e osteoclastos na remodelação óssea. O NO é um radical livre muito reativo e de curta-duração (D'Atillio et al.²⁰ 2004) produzido pela via metabólica L-arginina através da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) que promove ligação do oxigênio molecular e nitrogênio-guanidino terminal do aminoácido L-arginina (van't Hof, Ralston¹⁰³ 2001). Existem 3 isoformas de NOS: a forma neural (nNOS ou NOS-1) e endotelial (eNOS ou NOS-3), ambas NOS constitutivas (cNOS), e a forma indutiva (iNOS ou NOS-2), que é sintetizada sob ativação celular durante processos inflamatórios (Yoo et al.¹⁰⁷ 2004). A nNOS e a eNOS são expressas em baixos níveis nos seus tecidos de origem e sua atividade é regulada pela concentração de cálcio intracelular (D'Atillio et al.²⁰ 2004, van't Hof, Ralston¹⁰³ 2001). No caso específico de movimentação

ortodôntica, em que ocorre carga mecânica, o NO é produzido pela enzima eNOS, como resposta dos tecidos periodontais à força ortodôntica (Hayashi et al.⁴³ 2002, van't Hof, Ralston¹⁰³ 2001).

Segundo Burger, Klein-Nulend¹³ (1999), durante o movimento ortodôntico, na região de compressão do ligamento periodontal há baixa produção de NO, apoptose de osteócitos e subsequente atração de células osteoclásticas, aumentando a reabsorção óssea. Em contrapartida, no lado de tensão do ligamento periodontal há produção de sinalizadores, com destaque para o NO, que inibe a reabsorção por agir diretamente nos osteoclastos (MacIntyre et al.⁷¹ 1991) e estimula a formação óssea (Turner et al.¹⁰⁰ 1996). O NO inibe a atividade osteoclástica e o “turnover” ósseo por atuar na redução da expressão de RANK-L e aumentar a de OPG, resultando em redução da formação e atividade de osteoclastos (Fan et al.³² 2004), além de possuir capacidade protetora em relação às células endoteliais, inibindo sua apoptose (Rossig et al.⁸⁸ 2000).

No entanto, Yoo et al.¹⁰⁷ (2004) observaram grande atividade de NOS no lado de compressão do ligamento periodontal, após 1 hora de movimentação ortodôntica, com diminuição significativa apenas após 3 a 6 horas, coincidindo com um estreitamento maior da largura do ligamento periodontal. Essa redução na largura do ligamento periodontal observada no tempo de 3 e 6 horas sugere que há uma redução do estiramento das fibras periodontais e conseqüente redução do movimento dos fluidos intersticiais resultando em redução de atividade de NOS como observado em estudos in vitro (Tan et al.⁹⁷ 2006). No entanto, o aumento na atividade de NOS

nas primeiras horas após a aplicação da força ortodôntica, sugere a participação do NO também no processo de reabsorção óssea. Alguns estudos observaram que, com a inibição da atividade de NOS através de injeção do inibidor L-NAME, houve uma redução da taxa de movimentação ortodôntica sugerindo um importante papel do NO na remodelação óssea (Akin et al.¹ 2004, Hayashi et al.⁴³ 2002, Shirazi et al.⁹¹ 2002). Entretanto, Akin et al.¹ (2004) não obtiveram significância nessa diminuição, exceto quando foi injetada altas doses do inibidor. Efeito contrário é observado quando se administra o precursor de NO (L-arg), ou seja, há aumento da taxa de movimento ortodôntico e da remodelação óssea, sugerindo o aumento na produção de NO como responsável pelo aumento do movimento ortodôntico (Akin et al.¹ 2004, Shirazi et al.⁹¹ 2002). Estes diferentes achados quanto à função do NO durante a movimentação ortodôntica, indicam ações antagônicas desta molécula, as quais podem estar ligadas à sua concentração; porém, mais estudos são necessários para avaliar o verdadeiro papel do NO no movimento dentário.

Citocinas inflamatórias como, TNF- α , IL-1 e da IL-6, são produzidas por inúmeras células incluindo macrófagos, linfócitos T, fibroblastos, células endoteliais, osteoblastos, osteócitos, osteoclastos, cementoblastos e cementoclastos (Alhashimi et al.² 2001, Bu et al.¹² 2003, Schling et al.⁸⁹ 2006) e apresentam expressão aumentada durante o movimento ortodôntico por participarem do metabolismo ósseo (Krishnan, Davidovitch⁶² 2006).

IL-1 apresenta duas isoformas, IL-1 α e IL-1 β , com ação biológica local e sistêmica semelhantes (Krishnan, Davidovitch⁶² 2006), que afetam o

metabolismo ósseo estimulando a reabsorção (Gowen et al.³⁹ 1983, Heath et al.⁴⁴ 1985, Krishnan, Davidovitch⁶² 2006) e inibindo a formação óssea (Stashenko et al.⁹⁴ 1989). IL-1 β foi localizada imunohistoquimicamente em ligamento periodontal, espaços medulares do osso alveolar e em osteoclastos de felinos, mostrando ser um potente estimulador da reabsorção óssea (Davidovitch et al.²² 1988). Expressão aumentada de IL-1 α e β tem sido relatada em áreas de compressão (C) e tensão (T) dos tecidos periodontais, 1 a 3 dias após movimentação ortodôntica realizada em ratos (Alhashimi et al.² 2001, Bletsa et al.⁸ 2006) e em humanos (Dudic et al.²⁷ 2006). A partir do 7^o dia ocorre diminuição de IL-1 β para níveis equivalentes ao “baseline”. Acredita-se que durante o movimento dentário a ativação com força ortodôntica leva ao aumento na produção de IL-1 β seguido de um “feedback” negativo resultando na sua diminuição (Alhashimi et al.² 2001). No entanto, forças leves e constantes devem manter a expressão de IL- β por períodos maiores (Ren, Vissink⁸⁵ 2008).

IL-6 também possui importante papel na reabsorção óssea durante o movimento ortodôntico (Alhashimi et al.² 2001) e foi observada em grande quantidade no fluido crevicular gengival de pacientes após 24 horas da aplicação de força ortodôntica (Uematsu et al.¹⁰¹ 1996). Após 3 dias da ativação ortodôntica em ratos, essa citocina é encontrada com máxima indução no lado de C do ligamento periodontal (Alhashimi et al.² 2001).

TNF- α tem sido encontrada com expressão aumentada na região de T e de C após movimento ortodôntico em ratos, com preponderância para C (Bletsa et al.⁸

2006, Garlet et al.³⁵ 2007). O nível médio dessa citocina está aumentado no fluido crevicular gengival de humanos (Lowney et al.⁷⁰ 1995). Em contraponto, em um estudo com ratos, não foram encontrados níveis elevados de expressão de mRNA de TNF- α em nenhuma das regiões, embora os autores discutam que a análise da expressão protéica poderia apresentar diferentes resultados (Alhashimi et al.² 2001).

TNF- α e IL-1 agem sinergicamente aumentando o número de células pré-osteoclásticas (Hofbauer et al.⁴⁸ 1999) e estimulando a reabsorção óssea (Bertolini et al.⁷ 1986, Canalis¹⁴ 1987, Dinarello²⁴ 1989, Kobayashi et al.⁵⁸ 2000, Li, Stashenko⁶⁸ 1992). Após ativação ortodôntica, tem sido observado um aumento significativo de IL-1 β e TNF- α nos sítios experimentais (movimento ortodôntico) em relação aos sítios controle (sem movimento) com pico em 24 horas (Uematsu et al.¹⁰¹ 1996).

Citocinas inflamatórias e Doença Periodontal

A doença periodontal consiste em uma reação inflamatória de caráter infeccioso que envolve a destruição das estruturas de suporte do dente. Essa doença resulta do desequilíbrio no processo dinâmico saúde-doença entre as bactérias periodontopatogênicas com seus produtos e a resposta do hospedeiro frente à agressão (Gorska et al.³⁸ 2003). Após contato com bactérias periodontopatógenas e seus produtos, as células do hospedeiro produzem e liberam citocinas pró- e antiinflamatórias, induzindo e mantendo uma resposta inflamatória crônica no periodonto, com subsequente perda tecidual (Madianos et al.⁷² 2005). A liberação de

toxinas e produtos do metabolismo microbiano estimulam monócitos a secretarem mediadores inflamatórios, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , prostaglandina E₂, tromboxano B₂ e colagenase. Esses mediadores da inflamação ativam células endoteliais, fibroblastos, mais monócitos e osteoclastos para produzirem metaloproteinases de matriz e estimularem a reabsorção óssea (Cochran¹⁷ 2008, Graves⁴⁰ 2008). Essa cascata inflamatória produz inflamação clínica, perda de inserção, perda óssea, formação de bolsa periodontal e, eventualmente, perda dentária. Além da resposta inflamatória inata, ocorre também a ativação da resposta imune adaptativa, inicialmente com a resposta das células Th1 (T helper 1 - participação das citocinas pró-inflamatórias) seguida da resposta dominante das células Th2 (T helper 2 - participação das citocinas antiinflamatórias e das imunoglobulinas) (Champagne et al.¹⁵ 2003, Gemmell, Seymour³⁷ 1994).

Diversos estudos demonstraram o papel dos mediadores inflamatórios na patogênese da doença periodontal. O nível de IL-1 β e TNF- α encontra-se elevado em sítios periodontalmente ativos, havendo uma redução após a realização de terapia periodontal (Gamonal et al.³⁴ 2000, Gorska et al.³⁸ 2003, Graves, Cochran⁴¹ 2003, Roberts et al.⁸⁶ 1997, Silva et al.⁹² 2008, Zhong et al.¹⁰⁸ 2007) e altos níveis de IL-1 β estão associados com os sinais clínicos da doença periodontal e com a severidade da doença (Masada et al.⁷⁴ 1990, Zhong et al.¹⁰⁸ 2007). A IL-6 também apresenta papel na indução de reação inflamatória e reabsorção óssea alveolar na doença periodontal (Geivelis et al.³⁶ 1993, Krajewski et al.⁶¹ 2009).

A presença de NO na doença periodontal também reflete sua participação na reabsorção óssea e progressão da doença (Batista et al.⁶ 2002). A via de ativação da iNOS está associada à presença de citocinas inflamatórias e perda óssea. Altas concentrações de NO produzido pela via da iNOS causam ativação de osteoclastos através da maior expressão do gene de fator nuclear- κ B (van't Hof, Ralston¹⁰³ 2001), levando à destruição tecidual (Daghigh et al.²¹ 2002, Lappin et al.⁶⁴ 2000, Ugar-Cankal, Ozmeric¹⁰² 2006). A presença de inibidor de NOS em periodontite experimental induzida em ratos reduziu a perda óssea alveolar em 50% (Leitao et al.⁶⁶ 2005). A produção elevada de NO pode ser observada após ativação de iNOS por TNF- α , IL-1 β e IFN- γ em fibroblasto gengival humano, e com a adição de um inibidor específico para iNOS, mercaptoetil guanidina (MEG), ocorre diminuição da produção desse NO (Daghigh et al.²¹ 2002).

Doença Periodontal e Movimentação Ortodôntica

Durante a movimentação ortodôntica com forças leves, em sítios com ausência de doença periodontal, os mediadores inflamatórios estão presentes, porém não há perda de inserção e/ou altura óssea alveolar, mesmo em pacientes com periodonto reduzido, previamente acometidos por doença periodontal (Alstad, Zachrisson³ 1979, Boyd et al.¹⁰ 1989). Essa ausência de perdas periodontais adicionais também foi detectada em estudos histológicos em animais após vários tipos de movimentos ortodônticos, realizados em dentes com periodonto reduzido, com defeitos ósseos, porém com saúde tecidual (Cirelli et al.¹⁶ 2003, Polson et al.⁸⁰

1984). Acredita-se, porém, que em estado de doença periodontal, a perda óssea seja maior durante a movimentação ortodôntica (Daghigh et al.²¹ 2002, Ugar-Cankal, Ozmeric¹⁰² 2006). Em um estudo clínico foi observado que dentes com doença periodontal apresentam, quando movimentados, um aumento na atividade osteoclástica que acelera a taxa de destruição periodontal (Wennstrom et al.¹⁰⁵ 1993). Porém, em outro estudo foi observado que, ao movimentar dentes com lesões periodontais supra-ósseas, observa-se que as mesmas não são capazes de causar aceleração na destruição periodontal (Ericsson, Thilander³⁰ 1978). Atualmente, estes estudos clínicos e histológicos fornecem respaldo científico para o planejamento ortodôntico em pacientes previamente acometidos por doença periodontal destrutiva.

No entanto, estudos que avaliem as alterações histomorfométricas associando-as às condições moleculares nos tecidos periodontais de dentes sob movimentação ortodôntica na presença de doença periodontal são escassos. Estudos com estes propósitos são de fundamental importância para o melhor entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos na movimentação dentária.

Nós hipotetizamos neste projeto que a associação não benéfica entre movimentação ortodôntica e doença periodontal ocorra devido a uma potencialização dos mediadores inflamatórios presentes por ambas as condições. Também consideramos relevante avaliar a presença de NO através das enzimas eNOS e iNOS, uma vez que esse é o método mais utilizado para se estudar o NO, para entender o papel desta molécula na presença de doença periodontal e movimentação ortodôntica de forma isolada ou conjunta.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar *in vivo* a expressão de IL-1 β , IL-6, TNF- α , NOS (eNOS e iNOS) nos tecidos periodontais de dentes sob movimentação ortodôntica, em condições de saúde e doença periodontal, correlacionando-as às alterações histomorfométricas nesses tecidos.

Os objetivos específicos foram avaliar:

- 1- Níveis de mRNA dos genes eNOS, iNOS, IL-1 β , IL-6 e TNF- α no tecido gengival através da técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) quantitativa em tempo real.
- 2- Níveis das proteínas eNOS, iNOS, IL-1 β , IL-6 e TNF- α no tecido gengival através da técnica *Western blot*.
- 3- Perda óssea alveolar através de análise histomorfométrica.

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAL E MÉTODO

1) *Modelo animal*

Foram utilizados 88 ratos *Holtzman* machos e adultos, com peso médio de 300g, mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Os animais foram acomodados em gaiolas de polipropileno e receberam alimentação granulada (Labina/Purina) e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (#09/2008 – **Anexo 1**).

2) *Grupos de animais*

O número de animais utilizados foi determinado a partir dos períodos experimentais propostos, considerando 06 animais em cada grupo, por período experimental, exceto o grupo controle negativo que teve 04 animais por período. Sendo assim, os 88 animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais seguindo os períodos de sacrifício: *baseline* (somente grupos CONTR e DP), 3h (somente grupos MODP e MO), 1d, 3d e 7 dias.

- grupo CONTR (16 animais): grupo controle positivo sem nenhuma intervenção (ortodôntica ou periodontal).

- grupo MODP (24 animais): grupo submetido à indução de doença periodontal experimental e movimento ortodôntico.

- grupo MO (24 animais): grupo submetido ao movimento ortodôntico e ausência de doença periodontal.

- grupo DP (24 animais): grupo submetido à indução de doença periodontal experimental e ausência de movimento ortodôntico.

3) Indução de doença periodontal experimental

Neste estudo, foi utilizado o modelo de indução de doença periodontal por ligadura. Inicialmente os animais foram submetidos à anestesia geral (0,08 mL de ketamina e 0,04 mL de cloridrato de xilasina por 100g de peso corporal) por via intramuscular na pata posterior e foram em seguida posicionados em mesa operatória. O modelo de ligadura foi obtido com a colocação de um fio de algodão número 40 (Corrente) ao redor dos primeiros molares superiores bilateralmente (**Figura 1**).

Neste modelo de indução da doença periodontal, o acúmulo de microrganismos viáveis ao redor da ligadura implica na participação de diferentes antígenos ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como toxinas e produtos do metabolismo microbiano, DNA, flagelos e peptideoglicanos.

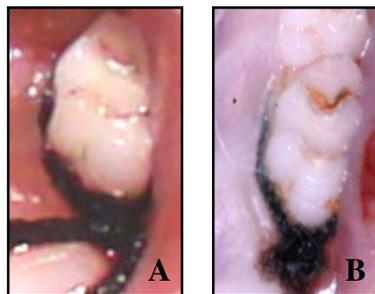


FIGURA 1- A- Visão do primeiro molar superior direito imediatamente após a colocação de ligadura;
B- Visão do primeiro molar superior direito 8 dias após a colocação de ligadura.

4) Instalação de aparelho ortodôntico

Foi utilizado um modelo de movimento dentário em ratos e um tipo de aparelho previamente estabelecidos ⁶⁵. Após os animais receberem anestesia geral, uma mola fechada de níquel-titânio (Sentalloy®, GAC, Dentsply), promovendo uma força de aproximadamente 50g de ativação, foi conectada entre o primeiro molar superior e incisivo central superior com fio de amarrilho (CrNi, 0.20 mm, código 55.01.208, Morelli) ⁶⁵. A mola de níquel-titânio foi usada para promover uma liberação de força constante durante o curso do experimento. Foram preparados sulcos nas superfícies mesial, distal e vestibular nos incisivos centrais maxilares para prevenir que o fio de amarrilho se soltasse dos dentes devido à curvatura lingual e à erupção contínua dos incisivos. Após os fios terem sido inseridos, uma fina camada de resina composta foi colocada acima do fio para prevenir seu deslocamento e irritação pulpar devido à exposição dentinária (**Figura 2**).

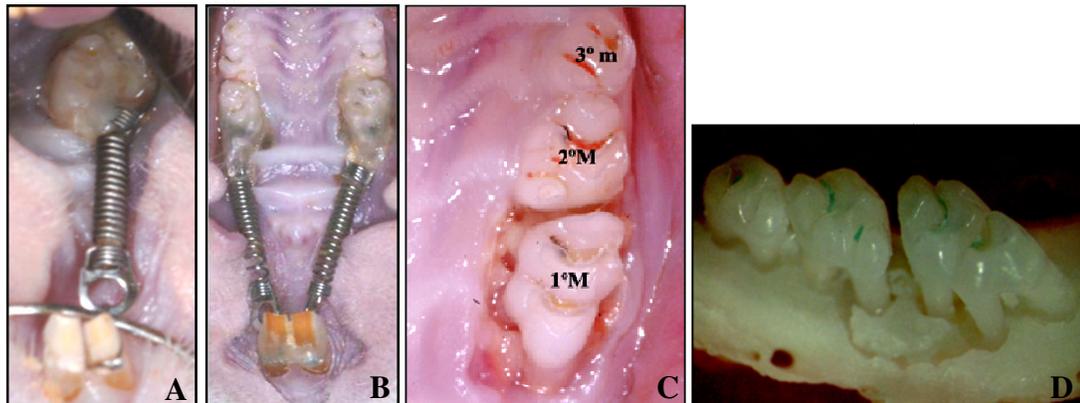
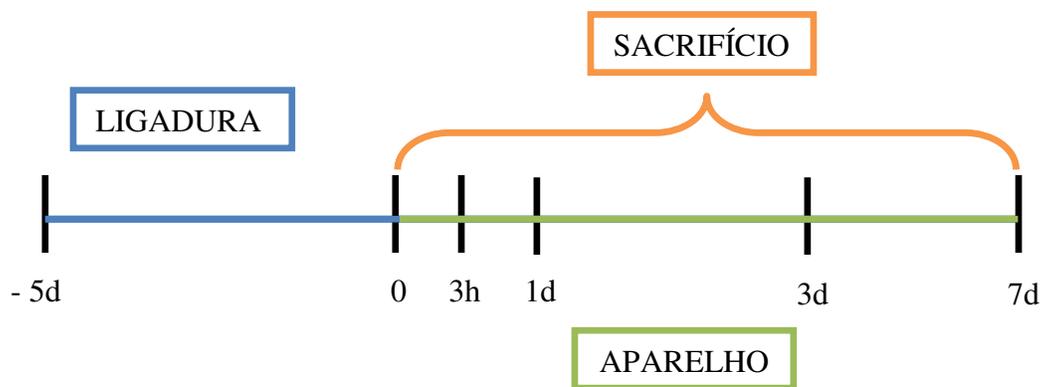


FIGURA 2 – Figura ilustrando o aparelho ortodôntico instalado na arcada superior de um animal antes (A) e após (B) a colocação de resina composta. Figura C mostra momento logo após a remoção do aparelho ortodôntico revelando o movimento dentário ocorrido e a figura D mostra o movimento ortodôntico ocorrido em uma hemimaxila de um animal do grupo MODP sacrificado no período de 7 dias.

5) *Delineamento experimental e sacrifício dos animais*



Após 3h, 1d, 3d e 7d do *baseline* (momento zero) do experimento, 06 animais de cada grupo foram sacrificados por overdose anestésica. A seleção destes períodos considerou a representação dos períodos precoces do desenvolvimento da resposta imune-inflamatória nos tecidos periodontais. Para os animais dos grupos com doença periodontal, a colocação das ligaduras para indução da doença ocorreu 5

dias antes do *baseline*. A instalação do aparelho ortodôntico e início da movimentação ocorreram no *baseline*. Nesta data, foram sacrificados animais representativos dos grupos CONTR e DP.

Após o sacrifício, a maxila de cada animal foi removida e separada em duas hemimaxilas, totalizando 12 peças/grupo/período, para posterior redução e distribuição aleatória através de sorteio para realização de histologia (4 hemimaxilas), extração de RNA total (4 hemimaxilas) e extração de proteínas totais (4 hemimaxilas). Para o grupo controle positivo (não manipulado), foram empregadas 2 hemimaxilas para histologia e 3 para os outros dois procedimentos acima descritos. Os tecidos coletados das peças destinadas à extração de RNA/Proteínas (**Figura 3**) foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80 °C.

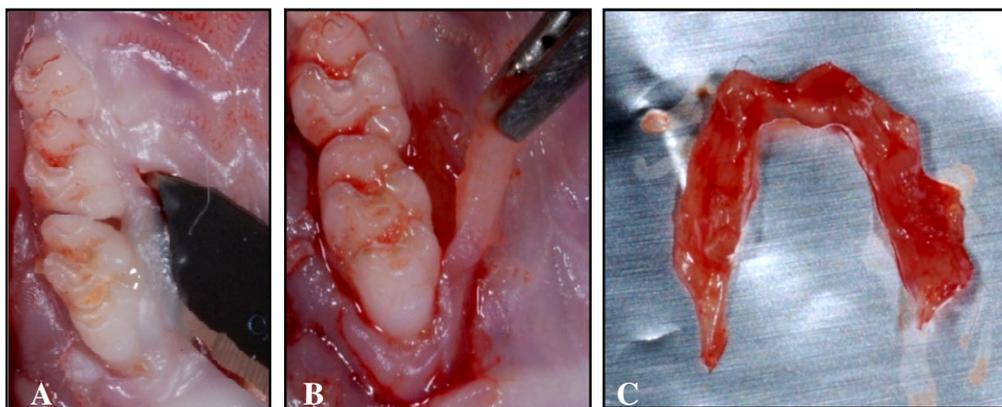


FIGURA 3 – Ilustração correspondente a realização do corte do colar gengival com lâmina de bisturi 15C ao redor do 1º molar superior esquerdo (A); remoção do colar gengival com o auxílio de uma pinça clínica (B); amostra de colar gengival (C).

6) Extração de RNA total e RT-PCR em tempo real

A presença de mRNA nos tecidos gengivais para as diferentes isoformas de NOS e para IL-1 β , IL-6 e TNF α foram avaliadas pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) de maneira quantitativa, em tempo real. Após o sacrifício dos animais, o tecido gengival ao redor de 4 primeiros molares superiores, coletados de 4 animais distintos de cada grupo com movimento ortodôntico/período foram separados em porção mesial e distal, referentes, respectivamente, aos lados de compressão e tensão gerados pelo movimento ortodôntico. O tecido mesial abrangeu da metade da face livre vestibular até a lingual e a porção distal abrangeu da metade da face livre vestibular e lingual até a distal.

6.1) Extração de RNA total

O RNA total dos tecidos coletados foi extraído com o kit *RNeasy Mini*® (catálogo nº 74106), da *Qiagen*®, segundo as instruções do fabricante. Este kit se baseia no método de colunas de purificação e inclui tratamento com DNase (*RNase-Free DNase Set* - catálogo nº 79254) de modo a eliminar contaminação com DNA genômico, que pode afetar os resultados da reação de PCR em tempo real.

O tecido coletado foi macerado em 400 μ L de solução *Buffer RLT* em tubo de 1,7mL com o auxílio de pilão plástico. Em seguida, o tecido lisado foi centrifugado por 3 minutos na velocidade máxima e o sobrenadante foi removido com o auxílio de pipeta e transferido para um novo tubo. O mesmo volume (400 μ L)

de etanol 70% foi adicionado à solução em suspensão e misturado cuidadosamente com a pipeta. Essa mistura foi transferida para um filtro (*RNeasy spin column*) contido num tubo coletor de 2 mL fornecido pelo kit e centrifugada a 10.000 rpm por 15 segundos. O filtrado foi descartado e o “cartucho” do filtro utilizado nos passos seguintes. Em seguida, seguiram-se os passos de purificação de RNA.

Para a purificação de RNA através da digestão de DNA, primeiramente, foram adicionados 350 μ L da solução Buffer RW1 ao filtro e o tubo foi centrifugado por 15 segundos a 10.000 rpm. O filtrado foi descartado e 80 μ L de solução (10 μ L de solução estoque DNase I + 70 μ L de solução *Buffer RDD*) foram adicionados diretamente sobre a membrana do filtro e os tubos foram deixados na bancada a 20-30°C por 15 minutos. O primeiro passo da purificação foi repetido e voltou-se aos passos da extração de RNA.

500 μ L da solução Buffer RPE foram passados pelo filtro, utilizando a centrífuga a 10.000 rpm por 15 segundos. Do mesmo modo, o filtrado foi descartado e o filtro preservado. O mesmo procedimento foi repetido, porém dessa vez, o tubo ficou por 2 minutos na centrífuga e o tubo com o filtrado foi descartado e outro tubo coletor fornecido pelo kit foi usado. Esse tubo foi centrifugado por 1 minuto na velocidade máxima. Em seguida, o filtro foi colocado em um novo tubo coletor de 1,5 mL fornecido pelo kit e 30 μ L da água RNase-free foram pipetados diretamente no centro da membrana do filtro e o tubo foi centrifugado por 1 minuto a 10.000 rpm. Esse procedimento foi repetido e o filtrado coletado no mesmo tubo resultando num total de 60 μ L de RNA.

A quantidade e pureza do RNA foram determinadas em espectrofotômetro de luz UV (*Biomate 3 - Thermo Electron Corporation*) por meio da avaliação das absorbâncias a 260 nm e da relação entre as absorbâncias a 260/280 nm, respectivamente. A integridade do RNA total foi avaliada por meio de resolução de 0,5 µg do RNA purificado em eletroforese em gel de agarose a 1%. A integridade foi determinada através de imagens digitalizadas do gel (*ImageQuant 100 – GE Healthcare*) com a observação de bandas bem definidas correspondentes aos fragmentos 18S e 28S do RNA ribossômico, sendo que a intensidade da banda correspondente ao fragmento 28S deve corresponder aproximadamente ao dobro da intensidade da banda correspondente ao fragmento 18S (**Figura 4**).



FIGURA 4 – Eletroforese em gel de agarose 1% para avaliar a integridade do RNA total extraído pela observação de bandas bem definidas correspondentes aos fragmentos 18S e 28S do RNA ribossômico de 6 amostras extraídas por modelo de indução da doença periodontal e por modelo de movimentação ortodôntica.

6.2) RT - Transcrição Reversa (síntese de cDNA)

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi feita por reação de transcrição reversa (RT) utilizando o kit *TaqMan Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems) em termociclador (*MyCycler - Bio-Rad*). Foram utilizados 385ng de RNA total por amostra na presença de Oligo-dT, dNTPs, MgCl₂, inibidor de

RNase e enzima de transcriptase reversa, de acordo com o protocolo do fabricante (*Applied Biosystems*).

6.3) PCR em Tempo Real

1 μL do produto da reação de RT foi utilizado num volume total de reação de PCR de 10 μL . Este volume incluiu, além do produto da reação de RT, água livre de nucleases, *TaqMan Gene Expression Master Mix* e *TaqMan Gene Expression Assays* (*Applied Biosystems*) para os genes alvo de rato. Os genes alvos, Assay ID #, Acession # e amplicon de cada *TaqMan Gene Expression Assay* estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Informações sobre os conjuntos de primers e sondas TaqMan pré-otimizados para PCR em Tempo Real (*TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems*)

| Gene alvo | Assay ID | Acession # | Amplicon (bp) |
|-------------------|---------------|-------------|---------------|
| Beta-actin (Actb) | Rn00667869_m1 | NM_031144.2 | 91 |
| iNOS | Rn00561646_m1 | NM_012611.3 | 77 |
| eNOS | Rn02132634_s1 | NM_021838.2 | 117 |
| IL-1 β | Rn00580432_m1 | NM_031512.2 | 74 |
| IL-6 | Rn99999011_m1 | NM_012589.1 | 90 |
| TNF- α | Rn99999017_m1 | NM_012675.2 | 108 |

Os ensaios de expressão gênica incluem um par de “primers” para PCR não marcado e uma sonda marcada com fluoróforo (FAM-labelled), que deve anelar ao molde do amplicon dos “primers” específicos; todos estes ensaios são pré-desenhados e otimizados pelo fabricante (*Applied Biosystems*) para detecção e

quantificação de sequências de cDNA específicas dos genes-alvo. As condições pré-otimizadas de ciclagem utilizadas foram: 50⁰C por 2 minutos, 95⁰C por 10 minutos, 95⁰C por 15 segundos e 55 ciclos de 60⁰C por 1 minuto. O RT-PCR em tempo real foi realizado em um equipamento *Real-Time PCR StepOnePlus* (Applied Biosystems) e a expressão gênica tanto dos genes-alvo quanto do gene constitutivo β -actina foi quantificada a partir do Δ CT. A expressão do gene-alvo foi normalizada para a expressão do housekeeping gene (β -actina).

7) *Western blot (WB)*

A expressão protéica de eNOS, iNOS, IL-1 β , IL-6 e TNF- α foi avaliada pelo método de *Western blot*. Para isto, foram utilizadas amostras de proteína total extraídas dos tecidos gengivais biopsiados ao redor de 4 primeiros molares superiores de 4 animais distintos de cada grupo, representativos dos diferentes períodos experimentais.

Um tampão de extração contendo T-PER (Tissue Protein Extraction Reagent - Pierce) e um coquetel inibidor de protease (Protein Stabilizing Cocktail - Pierce) foram preparados e adicionados aos tecidos, os quais foram macerados, centrifugados por 5 minutos a 13.000 RPM a 4^oC, com posterior remoção do sobrenadante. Os extratos de proteína foram quantificados pelo método de Bradford (Bio-Rad) e a leitura de absorbância a 595nm foi realizada em leitor de ELISA ELx 800 (Bio-Tek). Em seguida, as amostras de proteína foram homogeneizadas em tampão de amostra, contendo SDS 2% (3x SDS Sample Buffer Blue – Cell Signaling)

e 41.7mM de DTT (30x DTT Cell Signaling), e ajustadas a um volume final igual. A homogeneização foi feita em gelo, seguida de fervura para desnaturação protéica à 95°C por 5 minutos, posterior centrifugação de 30 segundos a 13000 RPM (centrífuga 5415D – Eppendorf) e manutenção em gelo por 5 minutos, procedimentos também realizados para o padrão de peso molecular biotilado (Cell Signalling).

Para o *Western Blot*, as amostras contendo quantidades iguais de proteína total (30µg) foram separadas em géis de poliacrilamida Tris-Cl a 10% (Mini-Protean 3 cell – Bio-Rad), utilizando voltagem constante de 100 V por 90 minutos, seguidos de eletro-transferência (Mini Trans-blot Electrophoretic Transfer Cell – Bio Rad) para membranas de nitrocelulose com poros de 0.45µM (Bio-Rad) durante 1 hora a 300 mA constante. Após o bloqueio em tampão Tris-NaCl + Tween (TBS-T) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (*blocking buffer*) por 1 hora sob agitação (TS-2000 VDRL shaker – Biomixer) à temperatura ambiente, as membranas receberam 3 lavagens de 5 minutos com tampão TBS-T a 0,1% e foram incubadas sob agitação (Mini Rocker MR-1 – Biosan) *overnight* a 4°C com os anticorpos primários para as proteínas de interesse: eNOS e iNOS (1:500 em PBS – Santa Cruz Biotechnology), IL-1β, IL-6 e TNF-α (1:500 em PBS – R&D Systems), além de GAPDH (1:500 em PBS - Santa Cruz Biotechnology) como controle de carregamento. Após remoção do excesso de anticorpo primário e 3 lavagens com TBS-T, foi realizada incubação com anticorpo secundário (conjugado à *horseradish peroxidase*) por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação (TS-2000 VDRL shaker – Biomixer). Para eNOS, iNOS e GAPDH foi utilizado um anticorpo anti-coelho e

para IL-1 β , IL-6 e TNF- α foi utilizado um anticorpo anti-cabra (1:1000 em *blocking buffer* – Santa Cruz Biotechnology). Em seguida, as membranas foram novamente lavadas e a detecção da presença das proteínas realizada por um sistema de quimioluminescência (LumiGlo, Cell Signaling). Imagens digitalizadas dos filmes radiográficos para Western blot foram obtidas em um sistema digital de fotodocumentação (ImageQuant 100 – GE Healthcare).

8) Análise histométrica

Após fixação em Formaldeído 4% (Paraformaldeído), 4 hemimaxilas de 4 animais distintos de cada grupo/período foram desmineralizadas em solução de EDTA 10% por 60 dias – com troca de solução 3 vezes por semana – para posterior inclusão em parafina. Cortes seriados de 4 μ m de espessura foram obtidos no plano sagital montados em lâminas de vidro. Em seguida, os cortes aderidos às lâminas de vidro foram corados por hematoxilina/eosina (H/E). As secções foram utilizadas para avaliação histométrica - medida da extensão linear nas regiões proximais mesial e distal e medida da área de perda óssea alveolar na região de furca. Estas análises foram realizadas por um examinador cego e calibrado, com o auxílio de um microscópio de luz Leica DMLS na magnificação de 100 e/ou 200x. As áreas de interesse dos cortes pré-selecionados foram fotografadas com uma câmera digital Leica DFC 300 FX e as imagens capturadas foram arquivadas no formato TIFF (*Tagged Image File Format*).

A análise histométrica foi feita através do software de imagem *Image J* versão 1.37b. (National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs>). A medida da distância da crista óssea alveolar à junção cimento-esmalte foi obtida, nas faces mesial (lado de compressão) e distal (lado de tensão) dos primeiros molares superiores (**Figura 5**). Já, na região de furca a área delimitada foi feita de acordo com a metodologia de Duarte et al.²⁶ (2006). A região delimitada foi de 1000 μm abaixo do ponto mais alto do teto da furca no espaço inter-radicular dos primeiros molares superiores. A área total da região inter-radicular e a área com tecido ósseo presente foram medidas, e através da subtração desses valores obteve-se a quantidade de tecido ósseo reabsorvido (**Figura 6**). Foi feita uma porcentagem dos valores obtidos para se ter a proporção de perda óssea.

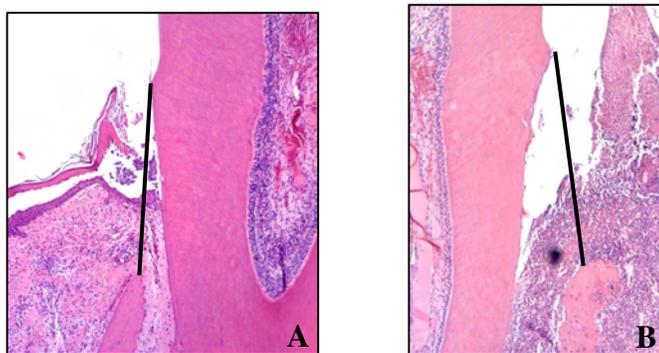


FIGURA 5 – Fotomicrografia representando a área para análise histométrica nas regiões mesial (A) e distal (B).

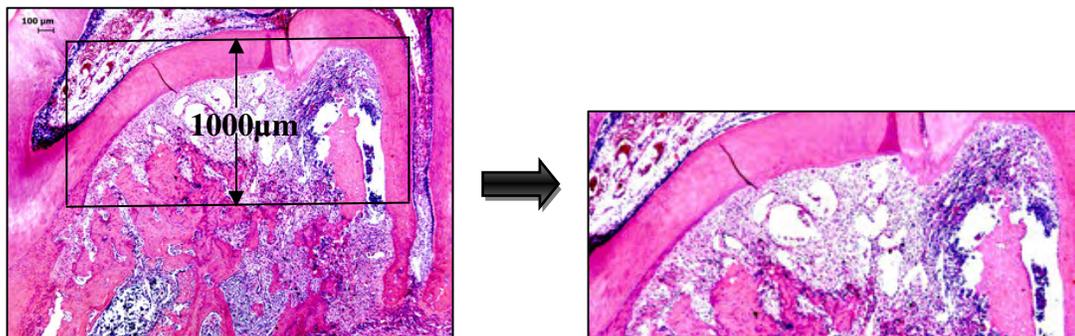


FIGURA 6 – Fotomicrografia representando a área delimitada para análise histométrica na região de furca dos primeiros molares superiores. Obteve-se a medida da área inter-radicular total da qual foi subtraída a medida da área com tecido mineralizado que resultou em área de perda óssea.

9) *Medição da área de reabsorção óssea*

Uma metodologia complementar para avaliar quantitativamente a reabsorção óssea foi realizada. Quatro peças de cada um dos grupos experimentais (3 horas, 1, 3 e 7 dias) cujos tecidos moles foram retirados para extração de RNA/proteínas, foram limpas e colocadas em peróxido de hidrogênio por 24 horas com a finalidade de remover os tecidos moles remanescentes. Posteriormente, as peças foram armazenadas em álcool 70 e coradas com azul de metileno. 1,4g de azul de metileno foram dissolvidos em 100 ml de etanol 95%. 5 ml dessa solução foram diluídos em 95 ml de água. Essa solução foi utilizada para corar as peças que permaneceram por 5 minutos nessa solução.

A face lingual das peças coradas foi fotografada em estereomicroscópio (*Leica MZ6*) juntamente com papel milimetrado (utilizado para calibrar o software de medição *UTHSCSA ImageTool 3.0*). A face lingual foi escolhida pelo fato da face vestibular apresentar tábua óssea que sobrepõe à crista óssea alveolar, impedindo a medição correta da reabsorção alveolar. A área

compreendida pela perda óssea do 1º molar superior foi medida (**Figura 7**) por examinador cego e treinado.

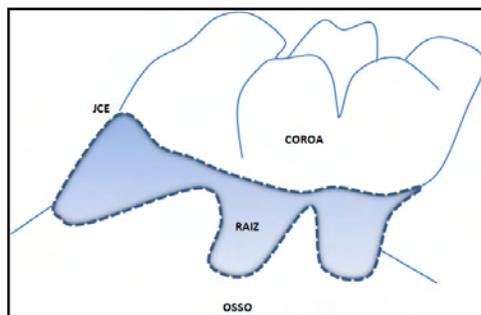


FIGURA 7 - Desenho representativo do 1º molar superior após remoção do tecido mole e coloração com azul de metileno. A área em azul corresponde à área de perda óssea alveolar calculada.

10) Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Para análise de reabsorção óssea e PCR em tempo real a análise estatística foi feita através da análise de variância one-way Anova seguido de comparação entre os grupos com o teste de Tukey. Foi considerado nível de 5% de significância como regra de decisão por uma diferença significativa.

RESULTADO

RESULTADO

1) RT-PCR em Tempo Real e Western blot

A análise dos resultados obtidos no presente estudo demonstra que os grupos teste (MO, DP, MODP) apresentaram aumento na expressão das enzimas iNOS e eNOS, bem como nos níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6, revelando o importante papel dessas moléculas tanto na doença periodontal quanto no movimento ortodôntico. Deve-se lembrar que a indução da doença ocorreu 5 dias antes do baseline, portanto, neste momento, as amostras do grupo DP já evidenciavam este aumento da expressão protéica. Todos os resultados da quantificação da expressão de mRNA e de proteína foram submetidos ao teste paramétrico *one-way ANOVA* complementado pelo teste de Tukey.

a) Expressão de iNOS

qPCR (**Figura 8**): No período de 3 horas os grupos com doença periodontal induzida (DP e MODP) apresentaram maior expressão de iNOS em relação aos grupos CONTR e MO, tanto na mesial quanto na distal, com diferenças significantes ($p < 0.05$). O pico de expressão de iNOS para todos os grupos teste ocorreu no período de 1 dia, correspondendo ao sexto dia de indução de DP e ao primeiro dia de movimentação ortodôntica. Neste período, todos os grupos apresentaram expressão maior em relação ao controle, com destaque para o grupo MODP que apresentou expressão média 12.8x maior que aquele grupo ($p < 0.05$). Aos

3 dias, há uma redução na expressão de iNOS para todos os grupos, porém, com permanência de valores mais altos para o grupo MODP, na região distal. Aos 7 dias, os valores são próximos dos observados aos 3 dias, porém com destaque para o grupo DP que apresentou expressão de iNOS estatisticamente maior em relação ao controle, tanto na mesial quanto na distal. Já os grupos MO e MODP apresentaram tendência a normalização da expressão de iNOS na mesial embora ainda mantendo valores mais altos que o controle na região distal.

WB (**Figura 9**): A expressão protéica de iNOS encontra-se aumentada nos grupos com doença (DP e MODP) em relação aos grupos Controle e MO, no período de 1 dia. Aos 3 e 7 dias as imagens sugerem uma redução na expressão desta enzima para os grupos teste para valores semelhantes ao controle. Ao compararmos somente os grupos teste, notamos uma maior expressão nos grupos doentes tanto para 3 como 7 dias. A expressão do controle endógeno, GAPDH, está representada na **Figura 10**.

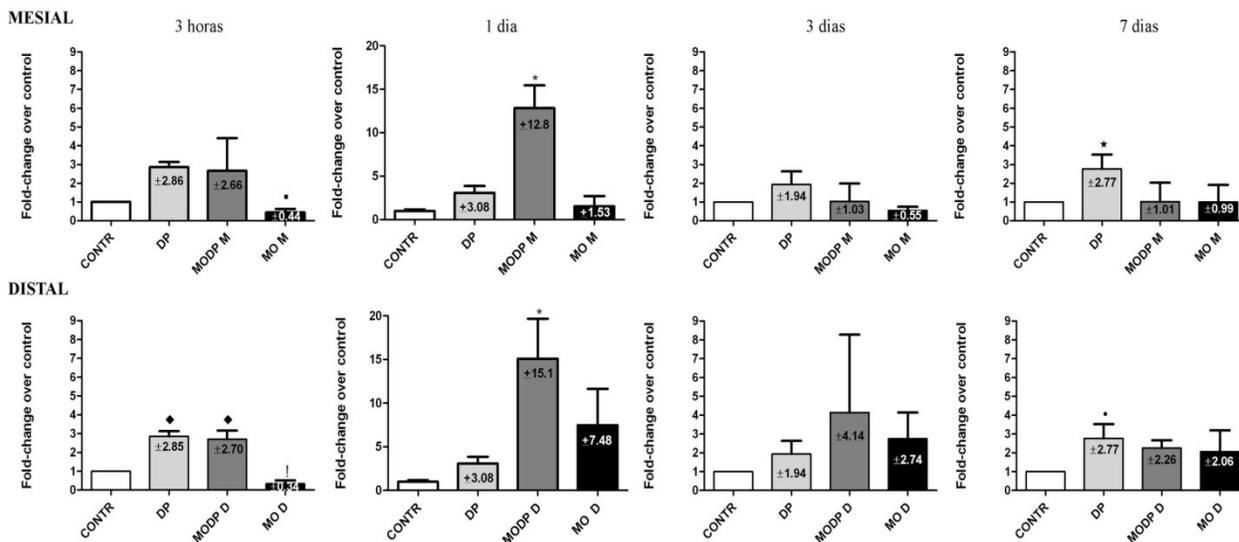


FIGURA 8 – Expressão de iNOS através da técnica RT-PCR Tempo Real em *fold-change* sobre o controle nas regiões mesial e distal. As barras nos gráficos indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão de 4 amostras por grupo de acordo com os períodos experimentais (3 horas, 1, 3 e 7 dias). Diferença estatística significativa ($p < 0.05$): ■ MO em relação ao DP e MODP; ♦ DP e MODP em relação ao MO e CONTR; ! C em relação ao MO; * MODP em relação a todos os outros grupos; ★ DP em relação a todos os outros grupos; • DP em relação ao CONTR.

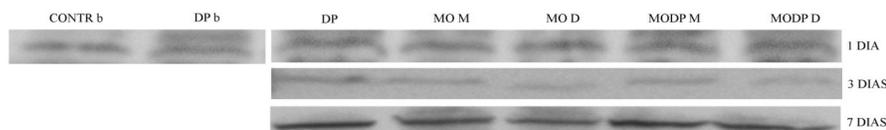


FIGURA 9 - Expressão de iNOS através da técnica *Western blot*, nos períodos experimentais de 1, 3 e 7 dias, sendo as amostras CONTR-b: controle baseline, DP-b: doença periodontal baseline, DP: doença periodontal, MO: movimento ortodôntico (M: mesial e D: distal), MODP: doença periodontal seguida de movimento ortodôntico (M: mesial e D: distal).

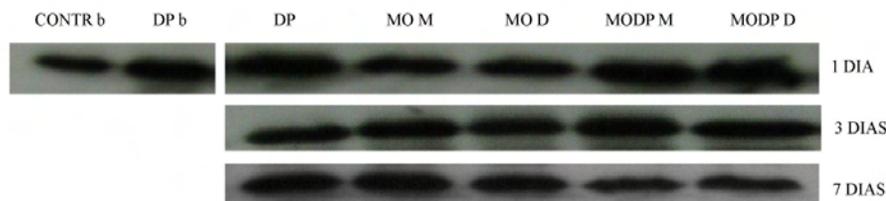


FIGURA 10 – Expressão de GAPDH através da técnica *Western blot*, nos períodos experimentais de 1, 3 e 7 dias, sendo as amostras CONTR-b: controle baseline, DP-b: doença periodontal baseline, DP: doença periodontal, MO: movimento ortodôntico (M: mesial e D: distal), MODP: doença periodontal seguida de movimento ortodôntico (M: mesial e D: distal).

b) Expressão de eNOS

qPCR (**Figura 11**): No período de 3 horas todos os grupos teste apresentaram expressão elevada de eNOS em relação ao CONTR, sendo que na região mesial, o grupo MODP apresentou diferença estatística significativa ($p < 0.05$). A partir de 1 dia, os níveis tendem a se normalizar, apesar de alguns sítios ainda apresentarem diferenças significativas com relação ao controle, como é o caso do grupo DP, na mesial e distal no período de 1 dia e do grupo MO na região mesial no período de 3 dias ($p < 0.05$). MODP também se apresenta elevado na região distal aos 3 dias, embora sem diferença significativa com os demais grupos.

WB (**Figura 12**): A expressão protéica de eNOS encontra-se aumentada nos grupos experimentais (DP, MODP e MO) em relação ao grupo Controle em todos os períodos e essa expressão parece aumentar com o tempo. Para o grupo MO observa-se maior expressão aos 3 dias, assim como para a distal do grupo MODP. Já para o grupo DP e a mesial de MODP parecem expressar mais eNOS no período de 7 dias.

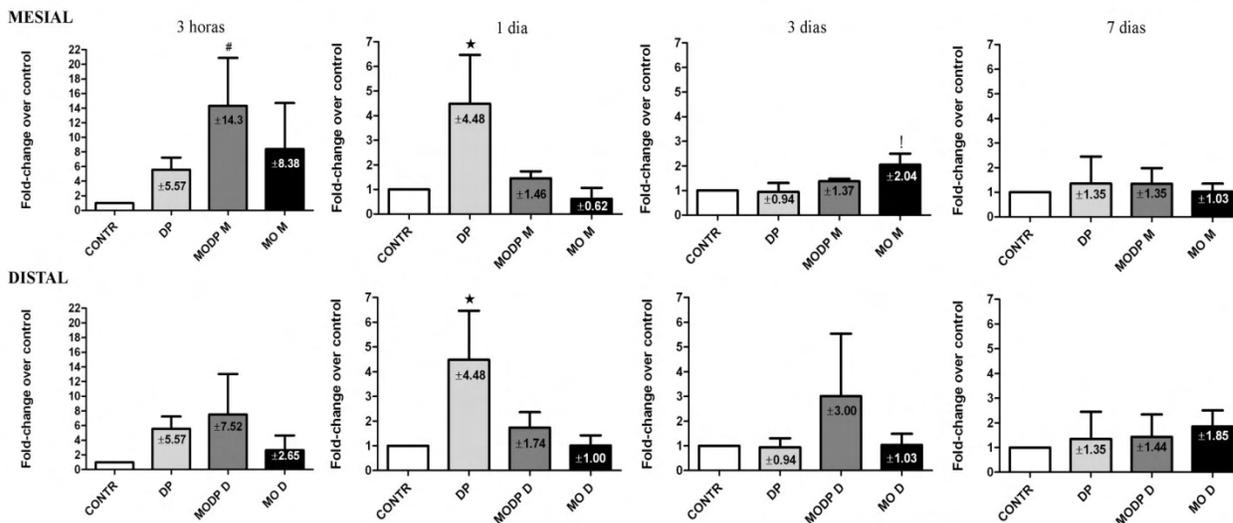


FIGURA 11 - Expressão de eNOS através da técnica RT-PCR Tempo Real em *fold-change* sobre o controle nas regiões mesial e distal. As barras nos gráficos indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão de 4 amostras por grupo de acordo com os períodos experimentais (3 horas, 1, 3 e 7 dias). Diferença estatística significativa ($p < 0.05$): # MODP em relação ao CONTR; ★ DP em relação a todos os outros grupos; ! MO em relação ao CONTR e DP.

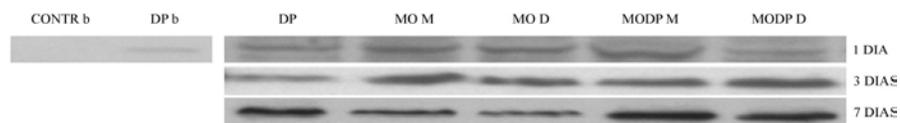


FIGURA 12 - Expressão de eNOS através da técnica *Western blot*, nos períodos experimentais de 1, 3 e 7 dias, sendo as amostras CONTR-b: controle baseline, DP-b: doença periodontal baseline, DP: doença periodontal, MO: movimento ortodôntico (M: mesial e D: distal), MODP: doença periodontal seguida de movimento ortodôntico (M: mesial e D: distal).

c) Expressão de *IL-1 β*

qPCR (**Figura 13**): No período de 3 horas os grupos doentes apresentaram níveis elevados de *IL-1 β* em relação aos demais. Em 1 dia, a expressão nos doentes se eleva ainda mais, com maior destaque ao grupo MODP, onde nota-se diferença estatística significativa em relação aos demais grupos, tanto na mesial quanto na distal ($p < 0.05$). Em 3 dias, o MODP ainda apresenta níveis elevados na região distal, com diferença estatística em relação ao DP e CONTR ($p < 0.05$). Nota-se neste período

uma tendência de aumento na expressão de IL-1 β no grupo MO, tanto mesial quanto distal. A partir de 7 dias a expressão tende a normalização em todos os grupos.

WB (**Figura 14**): No período de 1 dia observa-se um aumento da expressão de IL-1 β para os grupos teste em relação ao CONTR, porém com mais evidência para os grupos doentes. No período de 3 dias, as imagens sugerem um aumento em todos os grupos teste, que se mantém no período de 7 dias, principalmente no grupo DP.

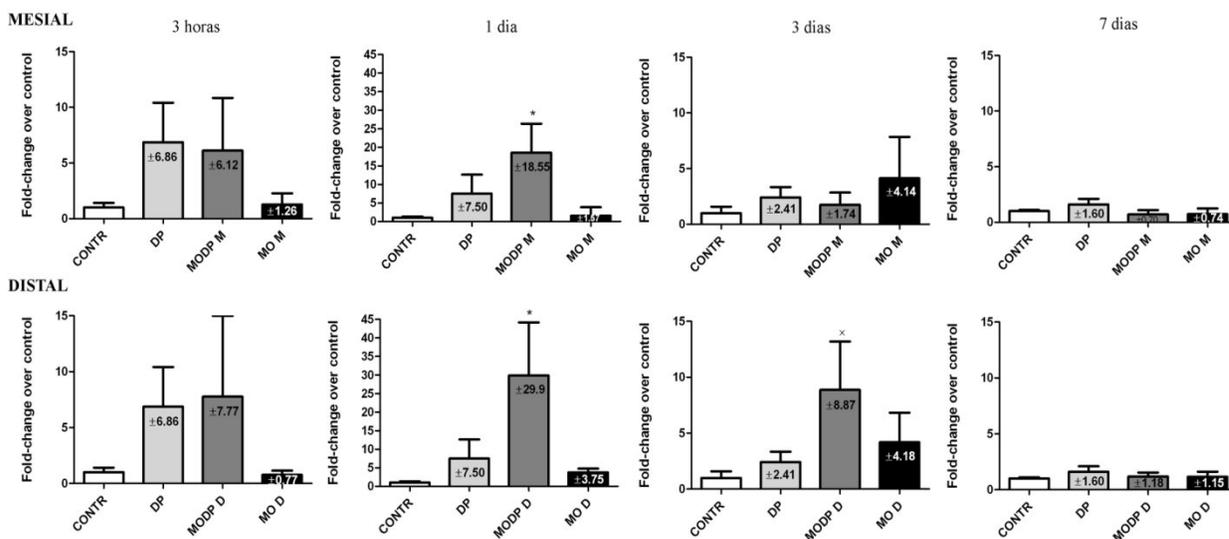


FIGURA 13 - Expressão de IL-1 β através da técnica RT-PCR Tempo Real em *fold-change* sobre o controle nas regiões mesial e distal. As barras nos gráficos indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão de 4 amostras por grupo de acordo com os períodos experimentais (3 horas, 1, 3 e 7 dias). Diferença estatística significativa ($p < 0.05$): * MODP em relação aos outros grupos; \times MODP em relação ao DP e CONTR.

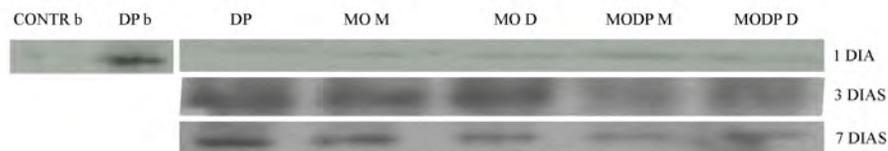


FIGURA 14 - Expressão de IL-1 β através da técnica *Western blot*, nos períodos experimentais de 1, 3 e 7 dias, sendo as amostras CONTR-b: controle baseline, DP-b: doença periodontal baseline, DP: doença periodontal, MO: movimento ortodôntico (M: mesial e D: distal), MODP: doença periodontal seguida de movimento ortodôntico (M: mesial e D: distal).

d) Expressão de TNF α

qPCR (**Figura 15**): Em 3 horas todos os grupos teste apresentaram tendência de aumento dos níveis de TNF α em relação ao CONTR, porém com maior expressão para os grupos com doença. No período de 1 dia, o grupo MODP aumentou em torno de 7 vezes em relação ao controle, apresentando diferença significativa ($p < 0.05$). A partir de 3 dias todos os grupos iniciam tendência de normalização dos níveis de mRNA, até que em 7 dias os níveis estão normalizados.

WB – nenhum dos experimentos realizados detectou a expressão protéica de TNF α .

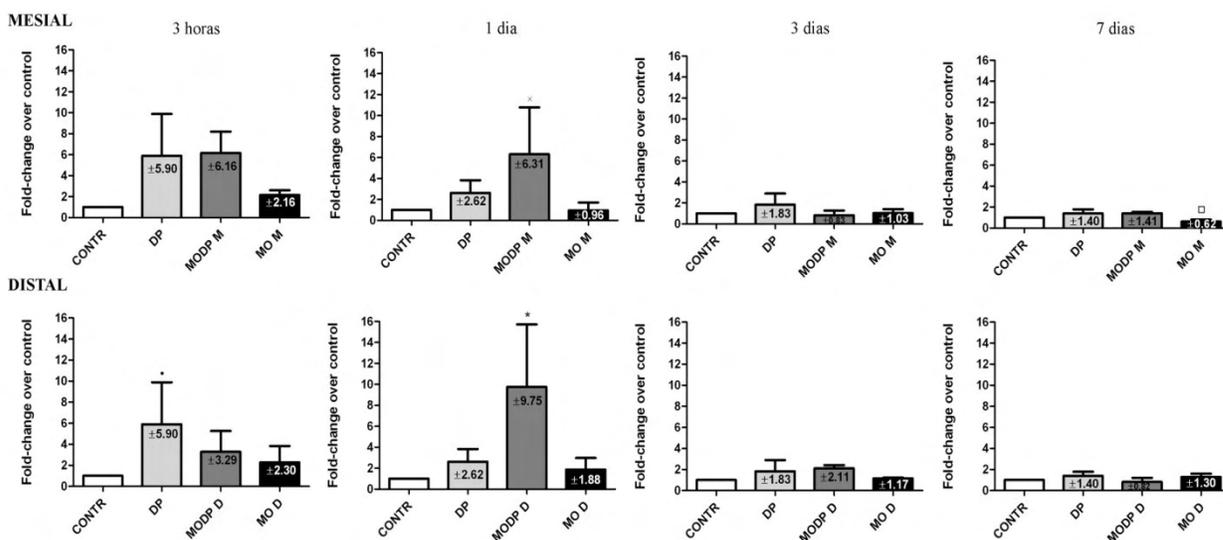


FIGURA 15 - Expressão de TNF- α através da técnica RT-PCR Tempo Real em *fold-change* sobre o controle nas regiões mesial e distal. As barras nos gráficos indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão de 4 amostras por grupo de acordo com os períodos experimentais (3 horas, 1, 3 e 7 dias). Diferença estatística significativa ($p < 0.05$): • DP em relação ao CONTR; × MODP em relação ao CONTR e MO; * MODP em relação aos outros grupos; □ MO em relação ao DP e MODP.

e) Expressão de IL-6

qPCR (**Figura 16**): No período de 1 dia os grupos doentes apresentaram níveis elevados de IL-6 em relação aos demais. Aos 3 dias, em geral há uma queda na expressão, porém os grupos sob movimentação ortodôntica mantêm níveis mais elevados, com diferenças significantes entre MO-mesial e controle e MODP-distal e controle ($p < 0.05$). Aos 7 dias, os níveis de IL-6 tendem a normalizar, mas os grupos sob movimentação continuam apresentando taxas mais elevadas em relação aos demais na região distal.

WB – nenhum dos experimentos realizados detectou a expressão protéica de IL-6.

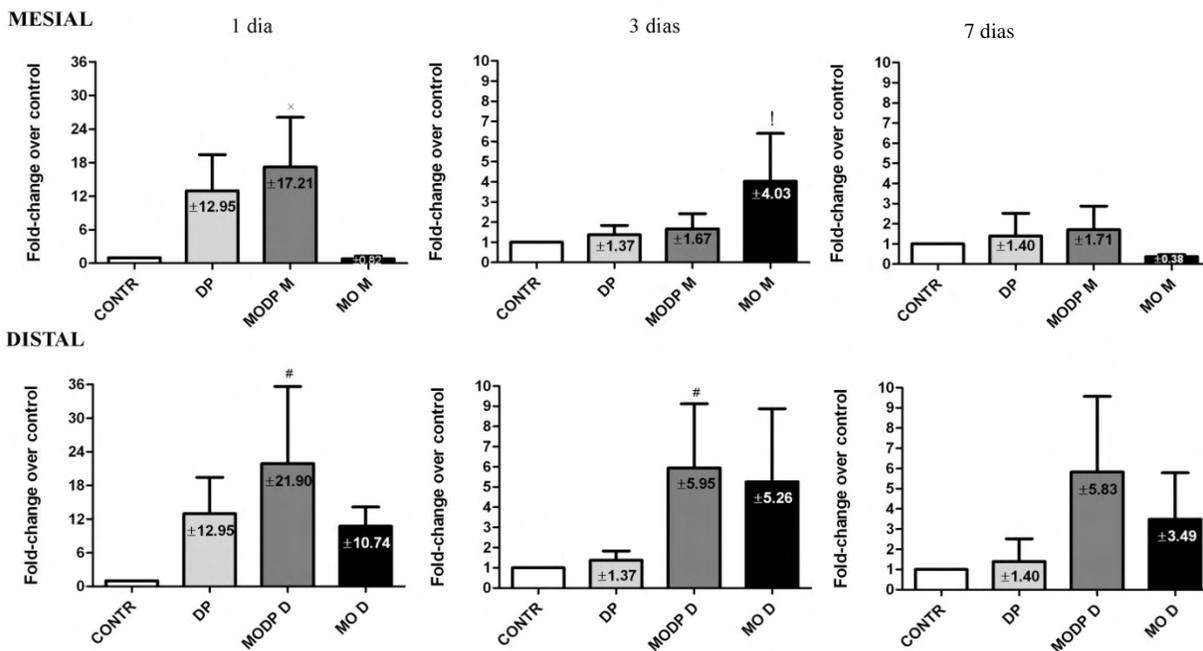


FIGURA 16 - Expressão de IL-6 através da técnica RT-PCR Tempo Real em *fold-change* sobre o controle nas regiões mesial e distal. As barras nos gráficos indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão de 4 amostras por grupo de acordo com os períodos experimentais (3 horas, 1, 3 e 7 dias). Diferença estatística significativa ($p < 0.05$): × MODP em relação ao CONTR e MO; # MODP em relação ao CONTR; ! MO em relação ao CONTR.

2) *Análise Histométrica da Perda Óssea Alveolar das Regiões Mesial, Distal e Furca*

a) *Região Mesial*

No período de 3 horas foi detectada maior perda óssea linear na região mesial nos grupos doentes, sendo que o DP apresentou diferença estatística em relação ao CONTR e ao MO ($p < 0.05$). Nos dias 1, 3 e 7, os grupos doentes apresentaram maior perda óssea em relação aos demais grupos com diferença significativa ($p < 0.05$) (**Figura 17**).

b) *Região Distal*

No período de 3 horas, os grupos doentes apresentaram maior perda óssea linear na região distal em comparação com os demais grupos ($p < 0.05$). Nos dias 1, 3 e 7, o grupo MODP apresentou perda óssea significativa em relação ao CONTR e ao MO ($p < 0.05$) (**Figura 17**).

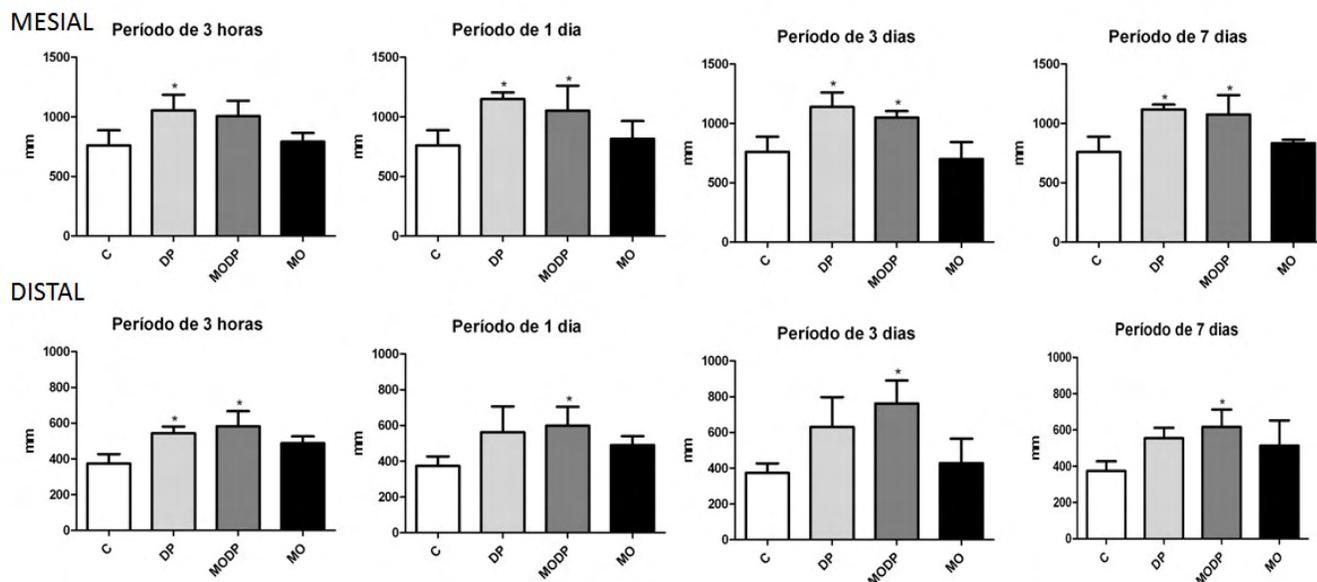


FIGURA 17 – Análise Histométrica: medida linear da perda óssea das regiões mesial e distal dos primeiros molares superiores nos períodos experimentais 3 horas, 1, 3 e 7 dias. Os gráficos apresentam média e desvio-padrão (μm) referente a 4 amostras por grupo. * Diferença estatística significativa ($p < 0.05$).

c) Região de Furca

Os grupos doentes apresentaram altas taxas de perda óssea desde o período de 3 horas, em virtude da presença de doença periodontal. Houve diferença estatística entre os grupos doentes para com os grupos CONTR e MO ($p < 0.05$). Em 1 dia e 3 dias, além dessa diferença estatística, observou-se ainda uma tendência do grupo MODP apresentar mais perda óssea que o DP. A partir de 3 dias houve uma tendência de início de perda óssea para o grupo MO. Em 7 dias a porcentagem de reabsorção desse grupo é equivalente aos outros grupos teste, sendo mais evidente na mesial da raiz distal (área de compressão do LP) (Figuras 18, 19, 20, 21).

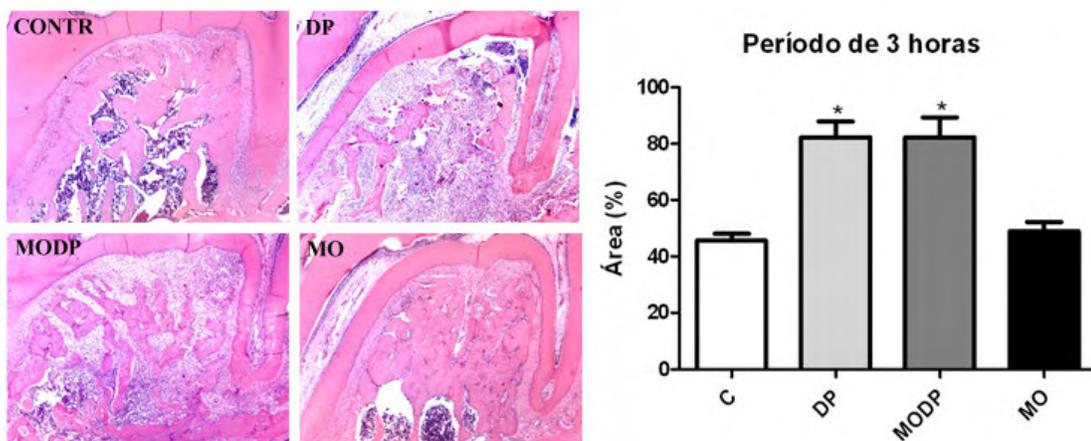


FIGURA 18 – Microfotografias ilustrando a área de reabsorção óssea na região de furca dos primeiros molares superiores que foram analisados quantitativamente. Regiões representativas de um dente por grupo no período experimental de 3 horas. O gráfico apresenta média e desvio-padrão (%) de perda óssea da região de furca. Hematoxilina e eosina; magnificação 50x. *Diferença estatística entre os grupos ($p < 0.05$).

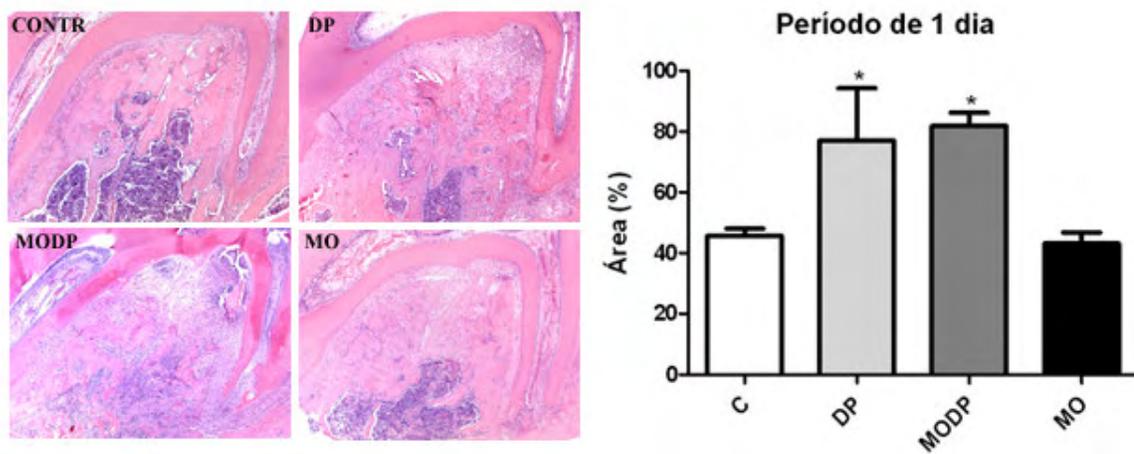


FIGURA 19 – Microfotografias ilustrando a área de reabsorção óssea na região de furca dos primeiros molares superiores que foram analisados quantitativamente. Regiões representativas de um dente por grupo no período experimental de 1 dia. O gráfico apresenta média e desvio-padrão (%) de perda óssea da região de furca. Hematoxilina e eosina; magnificação 50x. *Diferença estatística entre os grupos ($p < 0.05$).

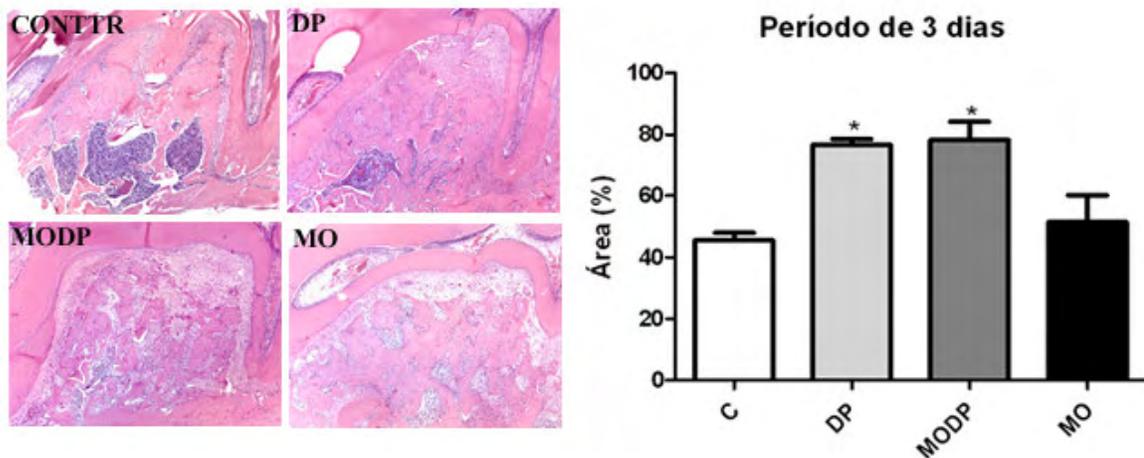


FIGURA 20 – Microfotografias ilustrando a área de reabsorção óssea na região de furca dos primeiros molares superiores que foram analisados quantitativamente. Regiões representativas de um dente por grupo no período experimental de 3 dias. O gráfico apresenta média e desvio-padrão (%) de perda óssea da região de furca. Hematoxilina e eosina; magnificação 50x. *Diferença estatística entre os grupos ($p < 0.05$).

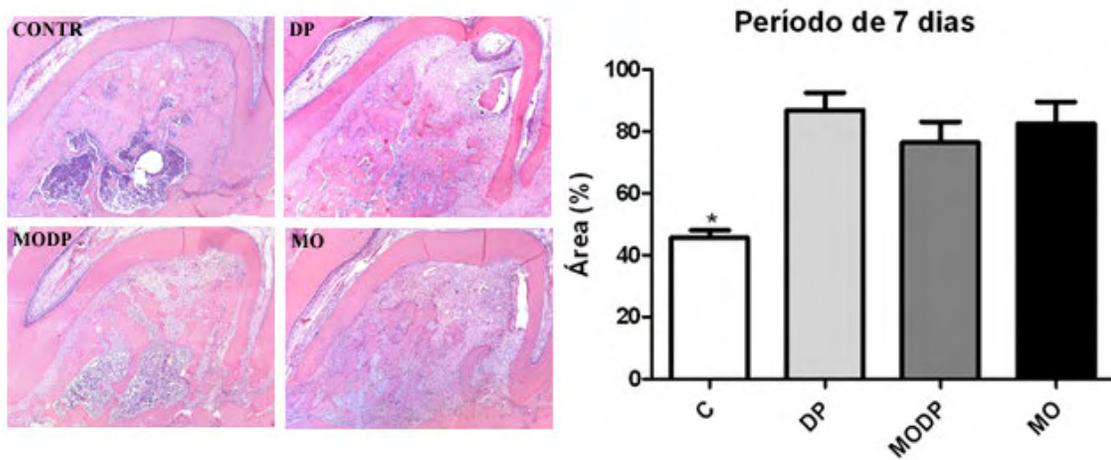


FIGURA 21 – Microfotografias ilustrando a área de reabsorção óssea na região de furca dos primeiros molares superiores que foram analisados quantitativamente. Regiões representativas de um dente por grupo no período experimental de 7 dias. O gráfico apresenta média e desvio-padrão (%) de perda óssea da região de furca. Hematoxilina e eosina; magnificação 50x. *Diferença estatística entre os grupos ($p < 0.05$).

3) Medida de Reabsorção Óssea - Morfometria

A área radicular supra-óssea dos animais experimentais e controles foi calculada. Os resultados foram submetidos ao teste paramétrico *One-way ANOVA* complementado pelo teste de Tukey para avaliar a diferença entre os períodos de indução da doença e da movimentação ortodôntica e estão apresentados nas figuras abaixo (**Figuras 22, 23, 24 e 25**).

Período Experimental de 3 horas

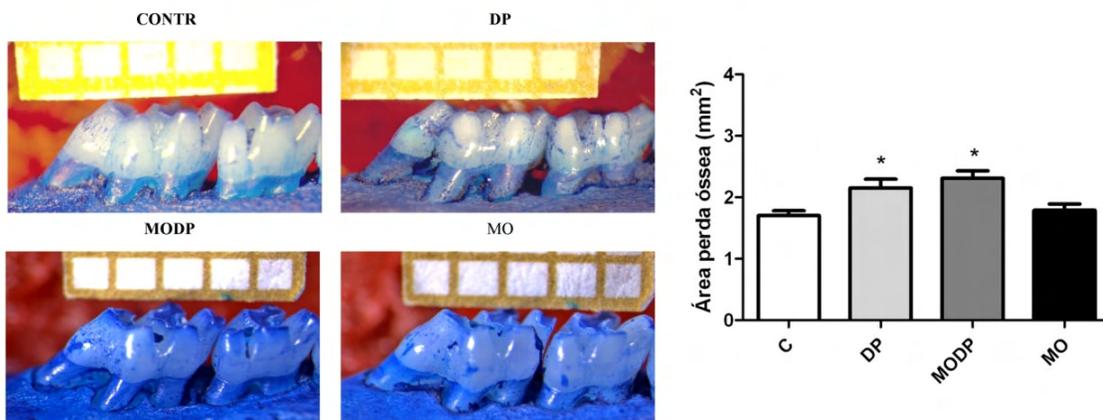


FIGURA 22 - Média e desvio padrão da área radicular supra-óssea (mm²), na face lingual dos molares superiores durante o período experimental de 3 horas (* $p < 0,05$ em relação aos outros grupos).

Período Experimental de 1 dia

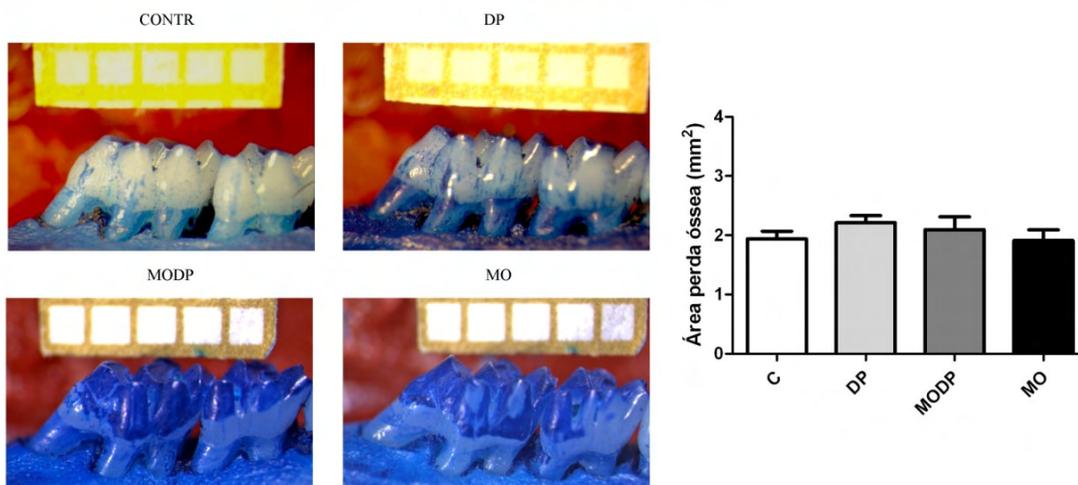


FIGURA 23 - Média e desvio padrão da área radicular supra-óssea (mm^2), na face lingual dos molares superiores durante o período experimental de 1 dia (* $p < 0,05$ em relação aos outros grupos).

Período Experimental de 3 dias

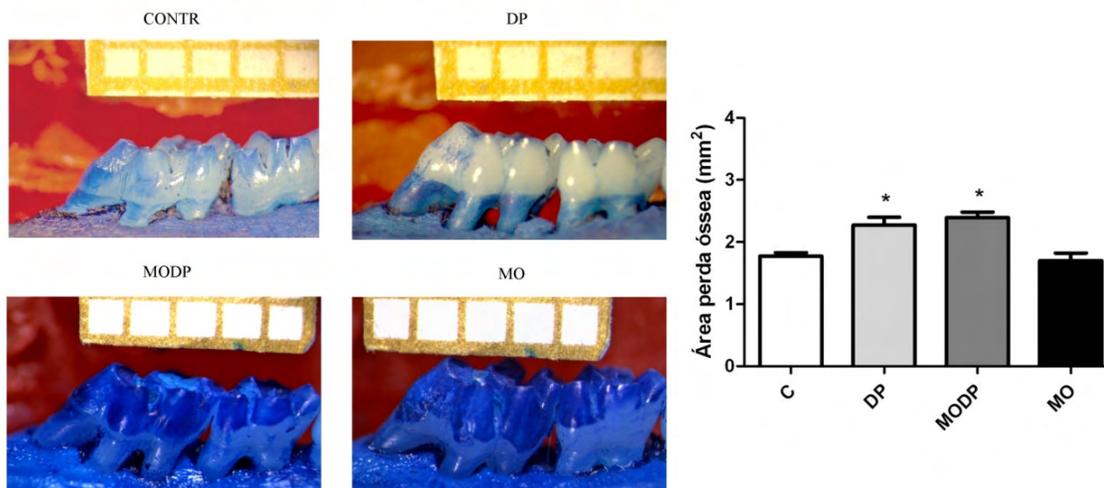


FIGURA 24 - Média e desvio padrão da área radicular supra-óssea (mm^2), na face lingual dos molares superiores durante o período experimental de 3 dias (* $p < 0,05$ em relação aos outros grupos).

Período Experimental de 7 dias

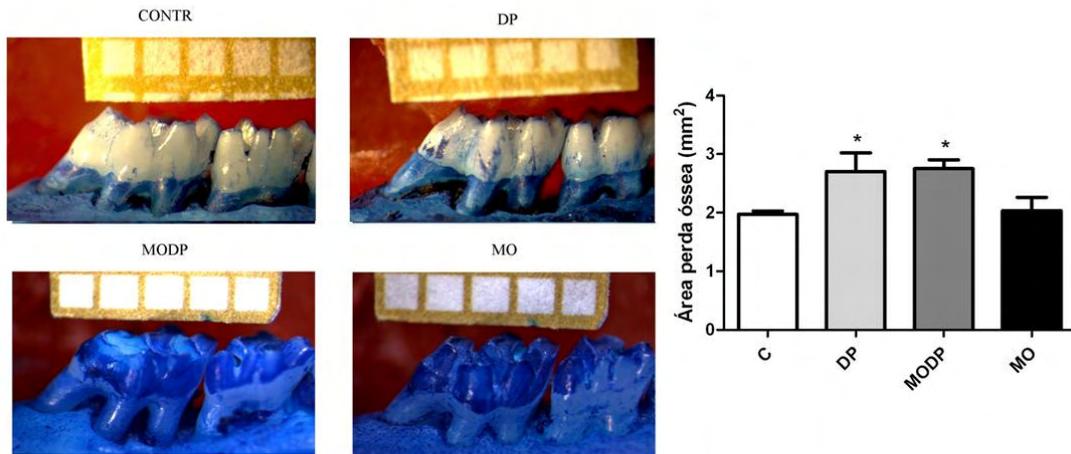


FIGURA 25 - Média e desvio padrão da área radicular supra-óssea (mm²), na face lingual dos molares superiores durante o período experimental de 7 dias (* p< 0,05 em relação aos outros grupos).

Nos períodos de 3 horas, 3 e 7 dias houve diferença significativa ($p < 0.05$) entre os grupos DP/CONTR, DP/MO, MODP/CONTR, e MODP/MO em relação à perda óssea macroscópica e não houve diferença estatística entre os grupos DP/MODP e CONTR/MO. A perda óssea mostrou-se expressiva nos grupos DP e MODP em todos os períodos e com aumento progressivo com o passar dos dias.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Vários estudos experimentais têm sido conduzidos para avaliar a resposta dos tecidos periodontais ao estímulo mecânico ou à indução de doença periodontal de forma isolada. Esse é o primeiro estudo que avalia a resposta desses tecidos ao estímulo conjunto do movimento ortodôntico e da doença periodontal induzida.

O modelo de indução de doença periodontal por ligadura utilizado neste estudo já está bem estabelecido na literatura e os resultados observados na mensuração da perda óssea pelos dois métodos empregados comprovam que a indução da doença periodontal em nosso estudo foi efetivamente realizada. O modelo de movimentação ortodôntica empregado também tem sido muito utilizado para determinar a contribuição de vários agentes endógenos e exógenos ao processo mecânico mediado por remodelação óssea^{2,8,28}. Esse modelo foi efetivo em nosso estudo uma vez que pudemos observar, embora não mensurado, um distanciamento entre os 1º e 2º molares superiores (**Figura 2- C e D**).

No presente estudo foi observado um significativo aumento de mRNA para todos os genes avaliados, em todos os grupos testes, com destaque maior para o grupo MODP, que apresentou os maiores picos de expressão para os genes iNOS, IL-1 β , TNF- α e IL-6, os quais ocorreram no período de 1 dia, e para eNOS, que ocorreu no período de 3 horas. Este destaque ao grupo MODP também foi observado na expressão dessas proteínas por WB, quando detectadas.

Estudos indicam que o NO é um mediador importante para o movimento ortodôntico e sua concentração está diretamente relacionada com a movimentação dentária^{1,91}. Outros relatam que o NO tem importante papel na doença periodontal^{23,66,87}. A atividade da enzima NOS foi avaliada como forma indireta de se avaliar a produção endógena de NO, apesar de ser um método que prevê nível de NO mais baixo do que o real⁴².

O NO age como mediador na formação óssea adaptativa³³, protege os osteócitos contra o processo de apoptose^{95,97}, e age como mediador da atividade osteoclástica¹⁰³. Altos níveis de NO impedem a formação de osteoclastos e reduzem sua atividade⁷¹, enquanto a redução na produção de NO produz efeito oposto^{18,96}. Em um estudo *in vitro*, foi observado que até o momento antes do processo de fusão de células mononucleares para formação de osteoclastos houve um intenso sinal de NO que desapareceu rapidamente após a fusão, sugerindo que o NO está envolvido na formação de osteoclastos como uma molécula sinalizadora de fusão. Durante a formação de osteoclastos, os inibidores da enzima NOS levam à inibição e redução dessa formação, já os precursores de NOS apresentam efeito oposto⁷⁷.

Além da relação do NO com células ósseas, níveis excessivos desse mediador podem levar a destruição tecidual devido à ativação de MMPs (metaloproteinases de matriz) e diminuição do nível dos seus inibidores (TIMPS: inibidor tecidual de metaloproteinases)¹¹.

A expressão de iNOS apresentou pico máximo nos grupos DP, MO e MODP ($p < 0.05$) no dia 1, sendo que os grupos com aparelho apresentaram maior

expressão na região distal (lado de tensão). Após 3 dias a tendência dos níveis foi de normalização, embora apresentassem valores mais altos que o controle na região distal. Para a expressão protéica, pudemos observar que os grupos doentes apresentaram maior expressão, principalmente no período de 1 dia.

Aumento na expressão de iNOS tem sido observado em sítios periodontais doentes quando comparados a sítios controle em humanos^{6,46,52,64}. Alguns estudos detectaram pico de iNOS entre 3 a 8 dias após a indução de doença periodontal em ratos^{23,69,87}, semelhante aos resultados obtidos em nosso trabalho, uma vez que no período de 1 dia o animal já se encontrava no 6º dia de indução da doença. Trabalhos *in vivo* que utilizaram inibidor específico para essa enzima – mercaptoetil guanidina – e compararam com inibidor não específico, observaram que NOS2 tem papel importante na doença periodontal^{21,66}.

De forma semelhante ao nosso estudo, outros confirmam a participação da enzima iNOS em sítios de compressão e tensão durante o movimento dentário^{20,78,98}.

O aumento de iNOS encontrado tanto no movimento ortodôntico quanto na doença periodontal pode ser explicado devido ao aumento de mediadores inflamatórios - IL-1 β , TNF- α e IFN γ - que estimulam a produção de iNOS por várias células. Além disso, a combinação dessas citocinas produz um efeito sinérgico na indução de iNOS^{53,82}. Outro estímulo da produção de iNOS que ocorre na doença periodontal é a endotoxina bacteriana que juntamente com citocinas (IL-1 β , TNF- α) aumenta a produção de NO e iNOS⁵⁴.

O próprio NO possui efeito bifásico na transcrição de iNOS. Quando a concentração de NO está baixa, após estimulação dos macrófagos por citocinas inflamatórias, ocorre a ativação de NF- κ B aumentando a produção de iNOS, que resulta em retroalimentação positiva. Já, quando a concentração de NO está alta, ocorre efeito oposto, ou seja, retroalimentação negativa prevenindo a produção exagerada de NO⁹⁹.

NO gerado pela enzima iNOS deve estar associado com reabsorção óssea, uma vez que citocinas e/ou LPS levam à produção de iNOS inibindo o crescimento e diferenciação de osteoblastos⁷³. A indução de iNOS no osso ocorre durante a inflamação e é provável que o NO e as prostaglandinas atuem juntas inibindo a expressão do fenótipo osteoblástico enquanto estimulam reabsorção óssea⁸¹. Inflamação persistente e indução de produção de iNOS por citocinas resultam num desequilíbrio de reabsorção óssea sobre a formação óssea, com preponderante destruição tecidual⁵³.

Observamos no grupo MODP pico de expressão de eNOS na região mesial (± 14.3) e distal (± 7.52) após 3 horas de colocação do aparelho. Também foi detectada maior expressão gênica nos outros grupos teste (DP e MO) em relação ao Controle. Esses níveis apresentaram redução a partir do período de 1 dia, porém o DP ainda apresentava expressão elevada em comparação aos demais grupos. Aos 3 dias o MO na mesial e o MODP na distal apresentaram um pequeno aumento, com

significância apenas para o primeiro. A expressão protéica foi maior nos grupos teste em relação ao Controle e apresentou tendência de aumento com o passar dos dias.

Apesar de não ser encontrado na literatura nenhum trabalho que indique a real participação de eNOS na doença periodontal, os resultados obtidos em nosso estudo indicam expressão aumentada dessa enzima nos grupos doentes, sugerindo a participação dessa enzima na doença periodontal.

Durante o movimento ortodôntico, tem sido observado aumento da atividade de eNOS em sítios de compressão se comparados com sítios controle no fluido crevicular gengival de humanos²⁰. Além disso, estudos *in vivo* detectaram imuno-histoquimicamente a presença de eNOS nos lados de tensão e pressão do ligamento periodontal durante o movimento ortodôntico em ratos^{78,98}. A expressão aumentada de eNOS foi observada *in vitro* através do estímulo de células ósseas humanas com PFF (fluxo de fluido pulsátil) quando comparadas com células sem estímulo⁵⁶. Esses estudos confirmam nossos achados, sugerindo que eNOS é um mediador importante na resposta ao estímulo mecânico.

Outro relevante achado desse estudo diz respeito ao fato de no lado mesial (lado de pressão) ocorrer expressão elevada de eNOS nos grupos com aparelho, fato esse que pode ser explicado pela vasodilatação e aumento na circulação sanguínea que ocorre nessa região de pressão, uma vez que essas enzimas estão presentes nas células endoteliais do ligamento periodontal, da gengiva e do osso alveolar²⁰.

Merece destaque o fato de que o grupo MODP apresentou aumento substancial em relação aos demais grupos evidenciando que quando associamos doença periodontal e movimento ortodôntico as expressões de iNOS e eNOS são exacerbadas.

Vários trabalhos têm detectado aumento das citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6, porém em condições de doença periodontal^{34,41,50,55,67,108} ou movimento ortodôntico^{2,5,8,27,60,85,101,106}, isoladamente. O presente estudo teve como característica unir essas condições e demonstrar que esse sinergismo gera aumento significativo dessas citocinas, além de observar aumento de suas expressões nos outros grupos teste (DP e MO) em relação ao controle.

Ênfase deve ser dada novamente ao grupo MODP devido ao aumento da expressão de citocinas inflamatórias, revelando que a resposta molecular se torna exagerada frente ao movimento de dentes com doença periodontal. Esse dado é de suma importância para a situação clínica, pois aponta que pacientes com problemas periodontais necessitam de acompanhamento rigoroso para manterem saúde periodontal, evitando assim possíveis danos aos tecidos.

Esses mediadores afetam o metabolismo ósseo e sua secreção é iniciada por vários estímulos, incluindo neurotransmissores, produtos bacterianos, outras citocinas e força mecânica. Particularmente no movimento ortodôntico, esse aumento parece estar envolvido com as mudanças biológicas que ocorrem durante o movimento dentário e não com a inflamação gengival causada por bactérias como na doença periodontal⁶². IL-1 β e TNF- α têm capacidade sinérgica de aumentar a

reabsorção óssea^{59,93}. Além disso, essas citocinas atrapalham o poder de reparo dos tecidos periodontais, pois induzem a apoptose das células produtoras de matriz^{4,47}. Induzem, também, a expressão de outros mediadores que amplificam ou mantêm a resposta inflamatória, estimulam a produção de metaloproteinases de matriz e podem aumentar a atividade fagocítica^{25,79}. Em nosso trabalho, níveis altos de IL-6 foram expressos nos grupos com aparelho (MODP e MO) na região distal se comparado com os demais grupos. Isso pode ser explicado pelo importante papel dessa citocina na remodelação do osso alveolar e manutenção do tecido periodontal regulando a diferenciação de osteoblastos nas células do ligamento periodontal⁴⁹. Além disso, a presença de IL-6 também é importante nas reações inflamatórias com a indução da formação de osteoclastos⁷⁶, o que explicaria sua maior expressão nos grupos doentes (MODP e DP).

O estudo da perda óssea a partir de análise histométrica linear apresentou como resultado maior perda nos grupos doentes tanto na região mesial quanto na distal, sendo que MODP apresentou a maior perda óssea na região distal ($p < 0.05$). Na região de furca, a área de perda óssea foi maior nos grupos doentes, com o grupo MODP apresentando tendência de maior perda nos períodos de 1 e 3 dias.

Outra técnica empregada para análise da perda óssea, a morfometria, apresentou resultados semelhantes ao histológico, com maior perda óssea para os grupos doentes. A perda óssea detectada nos grupos teste representa o que realmente ocorre durante o movimento ortodôntico e a doença periodontal. A diferença nesse estudo foi avaliar a perda óssea quando essas condições estão presentes em conjunto.

A tendência de maior perda óssea para o grupo MODP na região distal (para todos os períodos) e de furca (para o período de 1 e 3 dias) indica a maior destruição periodontal nessa situação de doença e estímulo mecânico juntos.

A maior relevância de nosso trabalho se deve, portanto, aos resultados do grupo MODP que apresentou expressão maior, em comparação aos outros grupos, de todos os mediadores avaliados e, também, apresentou tendência de maior perda óssea nas regiões avaliadas. A relação entre esses resultados moleculares e histométricos/morfométricos tem extrema relevância clínica, pois sugere que a associação de movimento ortodôntico a dentes comprometidos com doença periodontal não controlada não deve ser realizada devido ao dano que pode ocorrer nos tecidos periodontais. É extremamente importante se restabelecer a saúde periodontal antes de se iniciar o movimento de dentes comprometidos.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Considerando as limitações do nosso estudo, podemos concluir que movimento ortodôntico e doença periodontal, induzem juntos um aumento diferenciado na expressão de mediadores inflamatórios nos tecidos periodontais, que está relacionado com a maior perda óssea alveolar. Nosso estudo sugere, também, que o movimento ortodôntico atua como um fator sinérgico à progressão e severidade da doença periodontal induzida em ratos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS *

1. Akin E, Gurton AU, Olmez H. Effects of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004; 126: 608-14.
2. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001; 119: 307-12.
3. Alstad S, Zachrisson BU. Longitudinal study of periodontal condition associated with orthodontic treatment in adolescents. *Am J Orthod.* 1979; 76: 277-86.
4. Amin AR, Dave M, Attur M, Abramson SB. COX-2, NO, and cartilage damage and repair. *Curr Rheumatol Rep.* 2000; 2: 447-53.
5. Basaran G, Ozer T, Kaya FA, Kaplan A, Hamamci O. Interleukine-1beta and tumor necrosis factor-alpha levels in the human gingival sulcus during orthodontic treatment. *Angle Orthod.* 2006; 76: 830-6.
6. Batista AC, Silva TA, Chun JH, Lara VS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Dis.* 2002; 8: 254-60.
7. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature.* 1986; 319: 516-8.

*De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site:

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

8. Bletsa A, Berggreen E, Brudvik P. Interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha expression during the early phases of orthodontic tooth movement in rats. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114: 423-9.
9. Bollen AM, Cunha-Cruz J, Bakko DW, Huang GJ, Hujoel PP. The effects of orthodontic therapy on periodontal health: a systematic review of controlled evidence. *J Am Dent Assoc.* 2008; 139: 413-22.
10. Boyd RL, Leggott PJ, Quinn RS, Eakle WS, Chambers D. Periodontal implications of orthodontic treatment in adults with reduced or normal periodontal tissues versus those of adolescents. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1989; 96: 191-8.
11. Brennan PA, Thomas GJ, Langdon JD. The role of nitric oxide in oral diseases. *Arch Oral Biol.* 2003; 48: 93-100.
12. Bu R, Borysenko CW, Li Y, Cao L, Sabokbar A, Blair HC. Expression and function of TNF-family proteins and receptors in human osteoblasts. *Bone.* 2003; 33: 760-70.
13. Burger EH, Klein-Nulend J. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *Faseb J.* 1999; Suppl 13: S101-12.
14. Canalis E. Effects of tumor necrosis factor on bone formation in vitro. *Endocrinology.* 1987; 121: 1596-604.
15. Champagne CM, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck JD, Offenbacher S. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2003; 31: 167-80.

16. Cirelli CC, Cirelli JA, da Rosa Martins JC, Lia RC, Rossa C, Jr., Marcantonio E, Jr. Orthodontic movement of teeth with intraosseous defects: Histologic and histometric study in dogs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003; 123: 666-73.
17. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008; 79 (Suppl 8): 1569-76.
18. Collin-Osdoby P, Rothe L, Bekker S, Anderson F, Osdoby P. Decreased nitric oxide levels stimulate osteoclastogenesis and bone resorption both in vitro and in vivo on the chick chorioallantoic membrane in association with neoangiogenesis. *J Bone Miner Res.* 2000; 15: 474-88.
19. Corrente G, Abundo R, Re S, Cardaropoli D, Cardaropoli G. Orthodontic movement into infrabony defects in patients with advanced periodontal disease: a clinical and radiological study. *J Periodontol.* 2003; 74: 1104-9.
20. D'Attilio M, Di Maio F, D'Arcangela C, Filippi MR, Felaco M, Lohinai Z, et al. Gingival endothelial and inducible nitric oxide synthase levels during orthodontic treatment: a cross-sectional study. *Angle Orthod.* 2004; 74: 851-8.
21. Daghigh F, Borghaei RC, Thornton RD, Bee JH. Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. *J Periodontol.* 2002; 73: 392-400.
22. Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL. Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dent Clin North Am.* 1988; 32: 411-35.

23. Di Paola R, Marzocco S, Mazzon E, Dattola F, Rotondo F, Britti D, et al. Effect of aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rats. *J Dent Res.* 2004; 83: 343-8.
24. Dinarello CA. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol.* 1989; 44: 153-205.
25. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996; 87: 2095-147.
26. Duarte PM, Goncalves P, Casati MZ, de Toledo S, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Estrogen and alendronate therapies may prevent the influence of estrogen deficiency on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodontal Res.* 2006; 41: 541-6.
27. Dudic A, Kiliaridis S, Mombelli A, Giannopoulou C. Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114: 416-22.
28. Dunn MD, Park CH, Kostenuik PJ, Kapila S, Giannobile WV. Local delivery of osteoprotegerin inhibits mechanically mediated bone modeling in orthodontic tooth movement. *Bone.* 2007; 41: 446-55.
29. Eliasson LA, Hugoson A, Kurol J, Siwe H. The effects of orthodontic treatment on periodontal tissues in patients with reduced periodontal support. *Eur J Orthod.* 1982; 4: 1-9.
30. Ericsson I, Thilander B. Orthodontic forces and recurrence of periodontal disease. An experimental study in the dog. *Am J Orthod.* 1978; 74: 41-50.

31. Ericsson I, Thilander B, Lindhe J, Okamoto H. The effect of orthodontic tilting movements on the periodontal tissues of infected and non-infected dentitions in dogs. *J Clin Periodontol.* 1977; 4: 278-93.
32. Fan X, Roy E, Zhu L, Murphy TC, Ackert-Bicknell C, Hart CM, et al. Nitric oxide regulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells. *Endocrinology.* 2004; 145: 751-9.
33. Fox SW, Chambers TJ, Chow JW. Nitric oxide is an early mediator of the increase in bone formation by mechanical stimulation. *Am J Physiol.* 1996; 270: E955-60.
34. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol.* 2000; 71: 1535-45.
35. Garlet TP, Coelho U, Silva JS, Garlet GP. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J Oral Sci.* 2007; 115: 355-62.
36. Geivelis M, Turner DW, Pederson ED, Lamberts BL. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol.* 1993; 64: 980-3.
37. Gemmell E, Seymour GJ. Modulation of immune responses to periodontal bacteria. *Curr Opin Periodontol.* 1994; 28-38.

38. Gorska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madalinski K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2003; 30: 1046-52.
39. Gowen M, Wood DD, Ihrle EJ, McGuire MK, Russell RG. An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature*. 1983; 306: 378-80.
40. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2008; 79 (Suppl 8): 1585-91.
41. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003 Mar;74(3):391-401.
42. Hall CN, Garthwaite J. What is the real physiological NO concentration in vivo? *Nitric Oxide*. 2009; 21: 92-103.
43. Hayashi K, Igarashi K, Miyoshi K, Shinoda H, Mitani H. Involvement of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2002; 122: 306-9.
44. Heath JK, Saklatvala J, Meikle MC, Atkinson SJ, Reynolds JJ. Pig interleukin 1 (catabolin) is a potent stimulator of bone resorption in vitro. *Calcif Tissue Int*. 1985; 37: 95-7.
45. Henneman S, Von den Hoff JW, Maltha JC. Mechanobiology of tooth movement. *Eur J Orthod*. 2008; 30: 299-306.

46. Hirose M, Ishihara K, Saito A, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. Expression of cytokines and inducible nitric oxide synthase in inflamed gingival tissue. *J Periodontol.* 2001; 72: 590-7.
47. Hock JM, Krishnan V, Onyia JE, Bidwell JP, Milas J, Stanislaus D. Osteoblast apoptosis and bone turnover. *J Bone Miner Res.* 2001; 16: 975-84.
48. Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone.* 1999; 25: 255-9.
49. Iwasaki K, Komaki M, Mimori K, Leon E, Izumi Y, Ishikawa I. IL-6 induces osteoblastic differentiation of periodontal ligament cells. *J Dent Res.* 2008; 87: 937-42.
50. Jandinski JJ, Stashenko P, Feder LS, Leung CC, Peros WJ, Rynar JE, et al. Localization of interleukin-1 beta in human periodontal tissue. *J Periodontol.* 1991; 62: 36-43.
51. Keles A, Grunes B, Difuria C, Gagari E, Srinivasan V, Darendeliler MA, et al. Inhibition of tooth movement by osteoprotegerin vs. pamidronate under conditions of constant orthodontic force. *Eur J Oral Sci.* 2007; 115: 131-6.
52. Kendall HK, Haase HR, Li H, Xiao Y, Bartold PM. Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2000; 35: 194-200.

53. Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis.* 2001; 7: 2-10.
54. Kim YS, Pi SH, Lee YM, Lee SI, Kim EC. The anti-inflammatory role of heme oxygenase-1 in lipopolysaccharide and cytokine-stimulated inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in human periodontal ligament cells. *J Periodontol.* 2009; 80: 2045-55.
55. Kinane DF, Winstanley FP, Adonogianaki E, Moughal NA. Bioassay of interleukin 1 (IL-1) in human gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *Arch Oral Biol.* 1992; 37: 153-6.
56. Klein-Nulend J, Helfrich MH, Sterck JG, MacPherson H, Joldersma M, Ralston SH, et al. Nitric oxide response to shear stress by human bone cell cultures is endothelial nitric oxide synthase dependent. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 250: 108-14.
57. Klein-Nulend J, van der Plas A, Semeins CM, Ajubi NE, Frangos JA, Nijweide PJ, et al. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB J.* 1995; 9: 441-5.
58. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med.* 2000; 191: 275-86.

59. Koide M, Suda S, Saitoh S, Ofuji Y, Suzuki T, Yoshie H, et al. In vivo administration of IL-1 beta accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats. *J Oral Pathol Med.* 1995; 24: 420-34.
60. Koyama Y, Mitsui N, Suzuki N, Yanagisawa M, Sanuki R, Isokawa K, et al. Effect of compressive force on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in osteoblastic Saos-2 cells. *Arch Oral Biol.* 2008; 53: 488-96.
61. Krajewski AC, Biessei J, Kunze M, Maersch S, Perabo L, Noack MJ. Influence of lipopolysaccharide and interleukin-6 on RANKL and OPG expression and release in human periodontal ligament cells. *APMIS.* 2009; 117: 746-54.
62. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006; 129: 469 e1-32.
63. Krishnan V, Davidovitch Z. On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2009; 88: 597-608.
64. Lappin DF, Kjeldsen M, Sander L, Kinane DF. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2000; 35: 369-73.
65. Leiker BJ, Nanda RS, Currier GF, Howes RI, Sinha PK. The effects of exogenous prostaglandins on orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1995; 108: 380-8.
66. Leitao RF, Ribeiro RA, Chaves HV, Rocha FA, Lima V, Brito GA. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2005; 76: 956-63.

67. Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res.* 2006; 85: 596-607.
68. Li YP, Stashenko P. Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and IL-6, but not IL-1, down-regulate the osteocalcin gene promoter. *J Immunol.* 1992; 148: 788-94.
69. Lohinai Z, Benedek P, Feher E, Gyorfi A, Rosivall L, Fazekas A, et al. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *Br J Pharmacol.* 1998; 123: 353-60.
70. Lowney JJ, Norton LA, Shafer DM, Rossomando EF. Orthodontic forces increase tumor necrosis factor alpha in the human gingival sulcus. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1995; 108: 519-24.
71. MacIntyre I, Zaidi M, Alam AS, Datta HK, Moonga BS, Lidbury PS, et al. Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88: 2936-40.
72. Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 Suppl 6: 57-71.
73. Mancini L, Moradi-Bidhendi N, Becherini L, Martinetti V, MacIntyre I. The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are cGMP dependent. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 274: 477-81.

74. Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1990; 25: 156-63.
75. Melsen B, Agerbaek N, Eriksen J, Terp S. New attachment through periodontal treatment and orthodontic intrusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1988; 94: 104-16.
76. Mundy GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J Periodontal Res.* 1991; 26: 213-7.
77. Nilforoushan D, Gramoun A, Glogauer M, Manolson MF. Nitric oxide enhances osteoclastogenesis possibly by mediating cell fusion. *Nitric Oxide.* 2009; 21: 27-36.
78. Nilforoushan D, Manolson MF. Expression of nitric oxide synthases in orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 2009; 79: 502-8.
79. Pfizenmaier K, Wajant H, Grell M. Tumor necrosis factors in 1996. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996; 7: 271-7.
80. Polson A, Caton J, Polson AP, Nyman S, Novak J, Reed B. Periodontal response after tooth movement into intrabony defects. *J Periodontol.* 1984; 55: 197-202.
81. Ralston SH. The Michael Mason Prize Essay 1997. Nitric oxide and bone: what a gas! *Br J Rheumatol.* 1997; 36: 831-8.
82. Ralston SH, Grabowski PS. Mechanisms of cytokine induced bone resorption: role of nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate, and prostaglandins. *Bone.* 1996; 19: 29-33.

83. Reitan K. Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. *Am J Orthod.* 1967; 53: 721-45.
84. Ren Y, Maltha JC, Van't Hof MA, Von Den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM, Zhang D. Cytokine levels in crevicular fluid are less responsive to orthodontic force in adults than in juveniles. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 757-62.
85. Ren Y, Vissink A. Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. *Eur J Oral Sci.* 2008; 116: 89-97.
86. Roberts FA, McCaffery KA, Michalek SM. Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. *J Dent Res.* 1997; 76: 1833-9.
87. Rodini CO, Batista AC, Dionisio TJ, Santos CF, Cunha FQ, Lara VS. Morphologic evaluation and expression of matrix metalloproteinases-2 and 9 and nitric oxide during experimental periodontal disease in rat. *J Mol Histol.* 2008; 39: 275-82.
88. Rossig L, Haendeler J, Hermann C, Malchow P, Urbich C, Zeiher AM, et al. Nitric oxide down-regulates MKP-3 mRNA levels: involvement in endothelial cell protection from apoptosis. *J Biol Chem.* 2000; 275: 25502-7.
89. Schling P, Rudolph C, Heimerl S, Fruth S, Schmitz G. Expression of tumor necrosis factor alpha and its receptors during cellular differentiation. *Cytokine.* 2006; 33: 239-45.
90. Scott P, Fleming P, DiBiase A. An update in adult orthodontics. *Dent Update.* 2007; 34: 427-8.

91. Shirazi M, Nilforoushan D, Alghasi H, Dehpour AR. The role of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Angle Orthod.* 2002; 72: 211-5.
92. Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguillon JC, et al. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol.* 2008; 35: 206-14.
93. Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RL, Ago JM. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol.* 1987; 138: 1464-8.
94. Stashenko P, Obernesser MS, Dewhirst FE. Effect of immune cytokines on bone. *Immunol Invest.* 1989; 18: 239-49.
95. Tan SD, Bakker AD, Semeins CM, Kuijpers-Jagtman AM, Klein-Nulend J. Inhibition of osteocyte apoptosis by fluid flow is mediated by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 369: 1150-4.
96. Tan SD, de Vries TJ, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, Everts V, Klein-Nulend J. Osteocytes subjected to fluid flow inhibit osteoclast formation and bone resorption. *Bone.* 2007; 41: 745-51.
97. Tan SD, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, Bronckers AL, Maltha JC, Von den Hoff JW, et al. Fluid shear stress inhibits TNFalpha-induced osteocyte apoptosis. *J Dent Res.* 2006; 85: 905-9.

98. Tan SD, Xie R, Klein-Nulend J, van Rheden RE, Bronckers AL, Kuijpers-Jagtman AM, et al. Orthodontic force stimulates eNOS and iNOS in rat osteocytes. *J Dent Res.* 2009; 88: 255-60.
99. Tripathi P, Kashyap L, Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007; 51: 443-52.
100. Turner CH, Takano Y, Owan I, Murrell GA. Nitric oxide inhibitor L-NAME suppresses mechanically induced bone formation in rats. *Am J Physiol.* 1996; 270: E634-9.
101. Uematsu S, Mogi M, Deguchi T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 1996; 75: 562-7.
102. Ugar-Cankal D, Ozmeric N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. *Clin Chim Acta.* 2006; 366: 90-100.
103. van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology.* 2001; 103: 255-61.
104. Wennstrom JL, Lindhe J, Sinclair F, Thilander B. Some periodontal tissue reactions to orthodontic tooth movement in monkeys. *J Clin Periodontol.* 1987;14: 121-9.
105. Wennstrom JL, Stokland BL, Nyman S, Thilander B. Periodontal tissue response to orthodontic movement of teeth with infrabony pockets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1993; 103: 313-9.

106. Yamamoto T, Kita M, Kimura I, Oseko F, Terauchi R, Takahashi K, et al. Mechanical stress induces expression of cytokines in human periodontal ligament cells. *Oral Dis.* 2006; 12: 171-5.
107. Yoo SK, Warita H, Soma K. Duration of orthodontic force affecting initial response of nitric oxide synthase in rat periodontal ligaments. *J Med Dent Sci.* 2004; 51: 83-8.
108. Zhong Y, Slade GD, Beck JD, Offenbacher S. Gingival crevicular fluid interleukin-1beta, prostaglandin E2 and periodontal status in a community population. *J Clin Periodontol.* 2007; 34: 285-93.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEEA nº 09/2008

Araraquara, 23 de junho de 2008

Senhores Pesquisadores:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em 20/06/2008, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Efeitos da movimentação ortodôntica na expressão de mediadores inflamatórios nos tecidos periodontais em rastos em condições de saúde ou doença periodontal induzida" (Proc. CEEA nº 09/2008) **AUTORIZA** a realização da pesquisa, ficando a aprovação vinculada à apresentação do **RELATÓRIO FINAL**.

Atenciosamente.


Profa. Dra. ELENY BALDUCCI ROSLINDO
Coordenadora do CEEA

Ao
Prof. Dr. JONI AUGUSTO CIRELLI
Pesquisador Responsável
Nesta

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 29 de março de 2010.

ANDRESSA VILAS BOAS NOGUEIRA