



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

VINICIUS CLEMENTE DA ROCHA

**INFLUÊNCIA DA DIABETES MELLITUS NA
MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA ASSOCIADA A DOENÇA
PERIODONTAL: avaliação histomorfométrica em ratos**

2016

VINICIUS CLEMENTE DA ROCHA

**INFLUÊNCIA DA DIABETES MELLITUS NA MOVIMENTAÇÃO
ORTODÔNTICA ASSOCIADA A DOENÇA PERIODONTAL. Avaliação
histomorfométrica em ratos**

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

Orientadora: Profa. Adj. Maria Aparecida Neves Jardimi

Co-Orientador: Prof. Adj. Weber José Ursi

São José dos Campos

2016

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

Clemente da Rocha, Vinicius

Influência da Diabetes Mellitus na movimentação ortodôntica
associada a doença periodontal: avaliação histomorfométrica em ratos.
/ Vinicius Clemente da Rocha. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.
58 f. : il.

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

Orientadora: Maria Aparecida Neves Jardini

Co-orientador: José Weber Ursi.

1. Aloxana. 2. Diabetes mellitus. 3. Movimentação dentária. 4.
Doenças periodontais. I. Aparecida Neves Jardini, Maria, orient. II.
Weber Ursi, José, co-orient. III. Instituto de Ciência e Tecnologia
de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. IV.
Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. V. UNESP -
Univ Estadual Paulista. VI. Título.

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

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 12 de janeiro de 2016
E-mail: viniciuscrocha89@gmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adjunta Maria Aparecida Neves Jardim (Orientadora)

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

Prof. Dr Milton Santamaria Jr

Fundação Hermínio Ometto
Uniararas
Campus Araras

Profa Dra Andrea Carvalho De Marco

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

São José dos Campos, 12 de janeiro de 2016

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha amada mãe Dulce e meu amado pai Dimas, por todo o auxílio, amor, educação, carinho e dedicação que tiveram comigo por toda a vida.

A meu irmão Michel e minha irmã Viviane, pelos conselhos e amor com que me acompanham sempre.

A minha namorada Adeline, pela paciência e ajuda em todos os momentos.

A minha tia Maria, por ter aberto as portas de sua casa para me receber desde que decidi me mudar para São José dos Campos, e por sempre me ajudar da melhor maneira possível.

A meu grande amigo e primo Felipe, pela sua amizade e ajuda a todos os momentos.

A minha querida avó materna Maria, pelo seu carinho e amor constante, mesmo à distância.

A minha querida avó paterna Dita, que com sua companhia e presença, me deu forças para estudar e hoje olha por mim no céu.

A minha madraستا Adrianna, que sempre se importou com o meu desempenho, oferecendo seu auxílio sempre que precisei. E a meu padrasto Tavares, pela companhia, carinho e ajuda.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Estadual Paulista (UNESP) de São José dos Campos, que me acolheu como estudante na Graduação e Pós-Graduação. Foi um orgulho ser um Unespiano durante todos esses anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, por todos os ensinamentos passados nesses últimos anos.

À Professora Maria Aparecida Neves Jardim, por me aceitar como seu orientando e dedicar seu tempo e trabalho durante o meu Mestrado.

À CAPES, pela contribuição financeira que propiciou a realização desse trabalho.

Ao Professor Milton, pela contribuição e ensinamentos envolvidos nesse trabalho.

A todos os funcionários da Universidade, desde a equipe da limpeza, portaria e segurança, até a equipe de biblioteca e secretaria, por permitir que o trabalho fosse realizado da melhor forma possível.

A todos que, de uma maneira ou de outro, contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE QUADROS E FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
RESUMO	11
<i>ABSTRACT</i>	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Diabetes Mellitus.....	17
2.2 Diabetes Mellitus e Doença Periodontal	20
2.3 Diabetes Mellitus, Movimentação Ortodôntica e Doença Periodontal	21
3 PROPOSIÇÃO	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Comitê de Ética	24
4.2 Animais	24
4.3 Distribuição da amostra	25
4.4 Indução da Diabetes experimental	26
4.5 Indução da Doença Periodontal.....	28
4.6 Instalação do dispositivo para movimentação dentária	30
4.7 Preparo e análise histológica.....	31
4.8 Análise histológica.....	31
4.9 Análise histomorfométrica	32
4.10 Análise estatística	35
5 RESULTADOS	36
5.1 Quantidade de movimentação dentária	36
5.2 Perda óssea	38
5.3 Densidade óssea	49
6 DISCUSSÃO	42

7 CONCLUSÃO	46
8 REFERÊNCIAS*	47
ANEXO A	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do experimento	26
Figura 2 - Injeção de aloxana via intraperitoneal para indução de Diabetes experimental	27
Figura 3 - Avaliação da glicemia obtida através de uma amostra de sangue da veia caudal. Local da punção (a) e obtenção da amostra (b)	28
Figura 4 - Ligadura para a indução da doença periodontal	29
Figura 5 - Mola instalada entre o primeiro molar e os incisivos do rato (a). Resina composta, colocada ao redor dos fios ortodônticos para prevenir injúrias ao animal e manter o aparelho em posição (b)	30
Figura 6 - Mediação de área de perda óssea (mm ²) através do programa ImageJ (a) e resultados obtidos (b)	32
Figura 7 - Ilustração das regiões para análise histomorfométrica incluindo a perda óssea e a densidade óssea	33

Figura 8 - Lâminas com coloração hematoxilina-eosina das regiões de furca para visualização da perda óssea e densidade óssea 34

Figura 9 - Gráfico de colunas (média \pm desvio padrão) obtidos em cada tipo de condição experimental em relação a quantidade de movimentação dentária 37

Figura 10 - Gráfico de colunas (média \pm desvio padrão) obtidos em cada tipo de condição experimental em relação a perda óssea 38

Figura 11 - Gráfico de colunas (média \pm desvio padrão) obtidos em cada tipo de condição experimental em relação a densidade óssea 40

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Distribuição dos grupos experimentais	25
Tabela 1 - Média e desvio padrão da perda óssea (mm ²)	36
Tabela 2 - Média e desvio padrão da densidade óssea (%)	38
Tabela 3 - Média e desvio padrão da quantidade de movimentação dentária (mm)	39

LISTA DE ABREVIATURAS

CS	=	Condição Sistêmica
DM	=	Diabetes Mellitus
DP	=	Doença Periodontal
MO	=	Movimentação ortodôntica
ND	=	Não diabético (normoglicêmico)
D	=	Diabético
PO	=	Perda Óssea
DO	=	Densidade Óssea
QM	=	Quantidade de Movimentação

Rocha VC. Influência da Diabetes Mellitus na movimentação ortodôntica associada a doença periodontal: avaliação histomorfométrica em rato [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2016

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi analisar histomorfometricamente a influência da Diabetes Mellitus na movimentação dentária associada à doença periodontal induzida em ratos. Para tal, foram utilizados ratos da linhagem Wistar do gênero masculino com noventa dias de idade, pesando em média 300g. As variáveis estudadas foram: doença periodontal, Diabetes Mellitus e movimentação ortodôntica, analisando a perda óssea, densidade óssea e quantidade de movimentação dentária. A indução da Diabetes Mellitus foi realizada através da diluição de aloxana monohidratada em solução salina estéril, na concentração dose de 150 mg/peso em kg do rato. Após trinta dias da aplicação da aloxana para obtenção da diabetes mellitus experimental, os animais receberam a indução da doença periodontal, realizada através da instalação de um fio de seda preto 3-0 colocado na região cervical do primeiro molar inferior. Sete dias após a obtenção da doença periodontal experimental, os animais foram anestesiados para a aplicação da movimentação ortodôntica, com o aparelho posicionado entre o primeiro molar inferior e os incisivos inferiores. Em todas as análises microscópicas qualitativas e quantitativas, foram avaliados cortes histológicos longitudinais na região do osso alveolar onde o dispositivo ortodôntico foi instalado. Para a obtenção dos resultados de quantidade de movimentação dentária, foi utilizado um paquímetro medindo a distância entre a mesial do primeiro molar inferior e a distal do segundo molar inferior. Já para obtenção dos dados de perda óssea e densidade óssea, a morfometria foi realizada através um sistema de análise de imagem (ImageJ), avaliando a área de furca nos dentes com e sem as ligaduras. A estatística descritiva se baseou no cálculo de médias e desvio padrão, enquanto a estatística inferencial foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que a Diabetes Mellitus possui efeito deletério para o animal, principalmente quando associada à doença periodontal e à movimentação ortodôntica. Notou-se também, que a doença periodontal

causa maior perda óssea, mesmo quando em animais normoglicêmicos, do que a Movimentação Ortodôntica em animais diabéticos, confirmando os efeitos danosos causados pela Periodontite. Quando se trata de quantidade de movimentação dentária, não foram notadas diferenças estatisticamente significantes entre animais com Diabetes e sem Diabetes. Os resultados permitem concluir que a Diabetes Mellitus causa danos, principalmente quando se trata de perda óssea e densidade óssea na área de furca e que mais estudos são necessários para elucidar de qual maneira a Diabetes Mellitus age em indivíduos com Doença Periodontal e em tratamento ortodôntico.

Palavras-chave: aloxana; Diabetes mellitus; Movimentação dentária; Doenças periodontais.

Rocha VC. *Influence of Diabetes Mellitus on orthodontic movement associated with periodontal disease: histomorfometric evaluation in rats [dissertation]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2016*

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze histomorphometrically the influence of Diabetes Mellitus on tooth movement associated with induced periodontal disease in rats. It were used rats of male Wistar ninety days old, weighing on average 300g. The variables studied were: periodontal disease, Diabetes Mellitus and orthodontic movement, analyzing bone loss, bone density and amount of tooth movement. Induction of Diabetes Mellitus was performed by dilution of alloxan monohydrate in sterile saline, at the concentration 150 mg/kg weight of rat. Thirty days after the alloxan application for obtaining the experimental diabetes mellitus, animals received induction of periodontal disease, carried out by installing a black silk thread 3-0 placed in the cervical region of the first lower molar. Seven days after obtaining the experimental periodontal disease, the animals were anesthetized for the application of orthodontic movement with the device positioned between the first lower molar and the lower incisors. In all quantitative and qualitative microscopic analysis, longitudinal histological sections were evaluated in the region of the alveolar bone where the orthodontic appliance is installed. To obtain the results of amount of tooth movement, were used a parking meter measuring the distance between the mesial of the mandibular first lower molar and the distal of the second molar. To obtaining the data bone loss and bone density, Morphometry was performed using an image analysis system (ImageJ), evaluating the furcation area on teeth with and without the bands. Descriptive statistics was based on the calculation of means and standard deviation while inferential statistics were performed by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test at 5% significance level. The results showed that diabetes mellitus has a deleterious effect on the animal, especially when associated with periodontal disease and orthodontic movement. It was noted also that periodontal disease causes a higher bone loss, even when in normoglycemic animals, than the orthodontic movement in diabetic animals, confirming the harmful effects caused by periodontitis. When it comes to the amount of tooth movement were not observed significant differences between animals with and without Diabetes Diabetes. The results suggest

that diabetes mellitus causes damage, particularly when it comes to bone loss and bone density in the furcation area and that more studies are needed to elucidate which way the Diabetes Mellitus acts in subjects with periodontal disease and orthodontic treatment.

Keywords: alloxan; Diabetes mellitus; Tooth movement; periodontal diseases.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente é cada vez maior o número de pacientes adultos que procuram terapia ortodôntica, sendo que por vezes ela é realizada em indivíduos que possuem condições sistêmicas que podem influenciar no resultado final da Movimentação Ortodôntica (MO). Dentre essas condições, destacam-se a Doença Periodontal (DP), o tabagismo e a Diabetes Mellitus (DM).

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

A inflamação é um importante requisito para a movimentação dentária induzida. A ativação de células inflamatórias e a consequente liberação de citocinas inflamatórias apresentam importante função sobre os tecidos mineralizados (Tonder, 1983; Lara et al., 2003). A fase inicial da movimentação dentária estimula a liberação de fatores químicos e elétricos das fibras nervosas sensoriais e desencadeiam a resposta inflamatória que modifica a microcirculação, acompanhada por migração de leucócitos a partir dos capilares sanguíneos (Ogawa et al., 2002; Perinetti et al., 2002). Esses eventos produzem alterações no osso circunjacente onde o processo contínuo de remodelação que é constituída

pelas etapas de ativação, reabsorção e remodelação, todas controladas por mediadores químicos e citocinas pró-inflamatórias são alteradas pela aplicação de forças ortodônticas (Heller, Nanda, 1979).

Desta forma, na presença de fatores modificadores da resposta inflamatória, como a DM, pode haver uma resposta exagerada do hospedeiro frente à MO e/ou mecanismos de reparo prejudicados. Além disso, a DM pode acelerar o colapso periodontal durante a movimentação dentária. Em um estudo de Vallarino et al. de 2011, foi demonstrado que animais diabéticos apresentavam maior perda de osso alveolar durante o processo de MO do que animais saudáveis ou bem controlados. Bensch et al., 2003, concluíram que durante a movimentação dentária aumenta o risco de perda óssea.

Adultos com DM que procuram tratamento ortodôntico podem apresentar DP, sendo essa caracterizada pela inflamação dos tecidos gengival e periodontal induzida pelo biofilme bacteriano e que leva à destruição dos tecidos periodontais e perda dos elementos dentais. Já está bem estabelecido que a presença de DM aumenta o risco para o aparecimento e/ou progressão de DP (Chapple e Genco, 2013). É óbvio que o completo tratamento periodontal e o controle de biofilme por parte do paciente devam anteceder ao tratamento ortodôntico, e a movimentação dentária seja iniciada somente após paciente estar engajado na terapia periodontal de suporte. Porém, há a possibilidade de recidiva da DP durante o tratamento ortodôntico. Visto isso, não há na literatura estudos que avaliem a influência e a relação entre DP e movimentação dentária na presença de DM. Dessa maneira, torna-se de grande interesse a influência da DM na MO associada à DP. Portanto, o presente estudo teve como finalidade avaliar essa hipótese.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diabetes Mellitus

A American Diabetes Association definiu a DM como uma doença crônica evolutiva que se caracteriza pelas alterações dos metabolismos devido à falta de insulina ou na sua capacidade de agir na transferência de glicose plasmática para as células (American Diabetes Association, 2009)

Calcula-se que cerca de 6% da população mundial seja portadora de DM. A DM é conhecida por estar associada a um grande número de doenças concomitantes e secundárias do sistema cardiovascular, bem como dos sistemas de suporte e o tecido articular (Reichert et al., 2009).

A DM tipo 1 é a que mais acomete pessoas jovens ao redor do mundo, representando cerca de 85% de todos os casos de diabetes em indivíduos com menos de 20 anos de idade (Soltesz et al., 2007). Em relação ao gênero, homens e mulheres são igualmente afetados em populações jovens (Wu et al., 2015).

Embora tenham etiologias diferentes, tanto a DM tipo 1 quanto a DM tipo 2, compartilham de sintomas comuns e complicações similares. A DM tipo 1 é uma doença autoimune específica

e resulta da falha do pâncreas em produzir insulina, como consequência da destruição das células beta-pancreáticas, produtoras desse hormônio, nas ilhotas de Langerhans (Expert Committee, 2002).

A literatura tem sugerido que o desenvolvimento precoce de DM tipo 1 pode comprometer a mineralização óssea a longo prazo (Rosenbloom et al., 1984; Wiske et al., 1982). Diversos estudos têm mostrado que a DM tipo 1 está associada a diminuição da massa óssea, sendo considerada como um fator predisponente ao desenvolvimento de osteoporose (Hui et al., 1985; Selby, 1988; Loder, 1988).

Já a DM tipo-2, conhecida como doença da maturidade, pois a prevalência aumenta com o passar dos anos, representa cerca de 90% dos casos. É caracterizada pela diminuição da secreção de insulina (Zimmet et al., 2001), além de estar associada ao sedentarismo e estresse.

A DM causa diversas complicações no organismo, como nefropatia, retinopatia e neuropatia (Fujii et al., 2008; Rákel et al., 2008). Além desses fatores, a diminuição no metabolismo do colágeno (Falanga, 2005) e de componentes do tecido de granulação, como glicoproteínas e mucopolissacarídeos (Galkowska et al., 2006), causa atraso na reparação tecidual (Lamster et al., 2008). Soma-se a isso, o fato de que os níveis séricos elevados afetam as células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos e tornam a membrana basal mais espessa e menos eficaz (Roy et al., 2003).

Os sintomas iniciais da DM incluem poliúria, polidipsia e perda de peso, muitas vezes acompanhada de infecção e geralmente ocorre como consequência de uma avaria na regulação imune, resultando em uma expansão de linfócitos T CD41 auto reativa e linfócitos B auto-produtoras de anticorpos e ativação do sistema imune inato, o que

colabora para destruir células beta produtoras de insulina (Bluestone et al., 2010).

A DM também apresenta sintomas bucais importantes, como membranas mucosas secas (xerostomia), candidose oral, ardência bucal e/ou lingual, dificuldades de cicatrização e infecções bucais recorrentes (Bensch et al., 2003).

Estudos epidemiológicos indicam que a gravidade das complicações da DM é geralmente proporcional ao grau de hiperglicemia (Mattila et al., 2010). Além das complicações citadas, a diabetes também afeta o metabolismo ósseo.

Evidências indicam que alterações metabólicas e endócrinas causadas por DM afetam a quantidade e qualidade óssea ao longo da vida (Valkusz, 2011; Wu et al., 2015). Tanto a DM tipo 1 quanto a DM tipo 2 estão associadas a maior risco de fratura. Além disso, a densidade mineral óssea é reduzida na presença de DM tipo 1 (Heap et al., 2004). Estudo com modelos de roedores também suporta a hipótese de que o osso diabético tem resistência mecânica reduzida, independentemente da densidade óssea. (Saito et al., 2006).

A diminuição da taxa de remodelação óssea pode explicar o aumento da fragilidade óssea em pacientes com DM. Com a diminuição da taxa de remodelação óssea, o osso mais velho não é substituído por osso novo, diminuindo assim a resistência mecânica óssea. Isso é confirmado por estudos que indicam que pacientes diabéticos apresentam diminuição da atividade osteoblástica (Krakauer et al., 1995).

Em relação a estudos com animais, resultados mostram que ratos diabéticos apresentavam maior perda de osso alveolar durante o processo de movimentação ortodôntica do que animais saudáveis ou bem controlados (Villarino et al., 2011). Em outro estudo,

Bensch e colaboradores, 2003, mostraram que durante a movimentação dentária em animais diabéticos, há um aumento no risco de perda óssea.

2.2 Diabetes Mellitus e Doença Periodontal

A DM e a DP são doenças crônicas que têm sido consideradas biologicamente ligadas (Tsai et al., 2002; Bullon et al., 2014), inclusive, estudos tem demonstrado que a diabetes é um dos principais fatores de risco para a DP (Löe et al., 1993; Preshaw, Bissett, 2013). O risco de Periodontite é cerca de 4 a 5 vezes maior em pacientes diabéticos quando comparados a pacientes sem a doença (Preshaw, Bissett, 2013).

Uma das explicações para isso é a ocorrência de alterações celulares e bioquímicas no periodonto como uma consequência de hiperglicemia prolongada (American Academy of Periodontology, 1996), como a oxidação de proteínas e lipídios (Schmidt et al., 1996), alterações no colágeno (Kaplan, Wagner, 2006), alterações celulares, como a função dos neutrófilos prejudicada (Inoue et al., 1997) e aumento na apoptose de osteoblastos periodontais e fibroblastos (Al-Mashat et al., 2006), o que afeta a reparação óssea (He et al., 2004).

Quando se refere à Gengivite, doença que precede a Periodontite e é caracterizada principalmente pela inflamação gengival, estudos mostram que a prevalência em crianças e adolescentes portadores de DM tipo 1 é quase o dobro da observada em crianças e adolescentes sem diabetes (Ryan et al., 2003).

O grau de controle metabólico da DM é um fator importante para o desenvolvimento e progressão da gengivite. O paciente

que possui bom controle da diabetes, reduz significativamente a prevalência de gengivite (Albandar et al., 2002; Katagiri et al., 2012). Do mesmo modo, a hiperglicemia persistente conduz a respostas imune e inflamatórias exageradas que são induzidas por agentes patogênicos periodontais (Chapple, Genco, 2013).

2.3 Diabetes Mellitus, Movimentação Ortodôntica e Doença Periodontal

O tratamento ortodôntico geralmente é realizado em indivíduos jovens saudáveis. No entanto, a cada dia mais adultos estão propensos a procurar tratamento ortodôntico (Bensch et al., 2003).

De um modo geral, a MO é obtida através da remodelação do osso alveolar em resposta à carga mecânica (Braga et al., 2011). A reabsorção óssea é causada pela atividade dos osteoclastos no lado da compressão e pela formação de osso novo no lado de tensão, induzida pelos osteoblastos (Villarino et al., 2011).

Uma alteração do estado metabólico que interfira na remodelação óssea pode resultar numa taxa diferente de movimentação dentária. Por conseguinte, a DM pode afetar a MO dos dentes (Holtgrave, Donath., 1989). Estes fatos sugerem que pacientes com DM podem responder ao tratamento ortodôntico de forma diferente quando comparados à pacientes sem a doença (Reichert et al., 2009). Já é claro, também, que o tratamento ortodôntico não deve ser realizado num paciente com DM não controlada (Bensch et al., 2003).

Um estudo de Holtgrave e Donath, 1989, revelou que as alterações específicas no periodonto, causadas pela DM, são mais pronunciadas após a MO e que esse fato ocorre pois pacientes portadores da doença, e especialmente aqueles não controlados ou mal controlados, têm uma maior tendência para a destruição periodontal, o que deve ser considerado no plano de tratamento ortodôntico como pacientes com doença periodontal. No entanto, ainda há muito o que se descobrir sobre como a DM afeta a movimentação ortodôntica (Braga et al., 2011).

A DP é uma das doenças bucais mais comuns e é caracterizada por perda de tecido conjuntivo e destruição do osso alveolar de suporte (Graves et al., 2001; Borrell, Papapanou, 2005). A Periodontite pode resultar na perda do dente e é encontrada em 5 % - 20 % da população adulta em todo o mundo (Wu et al., 2015).

Na presença a de forças ortodônticas, o periodonto sofre reações em relação a regeneração óssea, enfraquecimento do ligamento periodontal e microangiopatias na área gengival (Holtgrave, Donath, 1989).

A literatura tem mostrado que os estímulos gerados em resposta ao estresse mecânico durante a movimentação dentária induzida medeiam alterações teciduais que em conjunto com a ativação dos mediadores químicos resultam em nova condição de homeostasia periodontal (Toms et al., 2000).

3 PROPOSIÇÃO

Analisar a influência da DM na movimentação dentária associada a DP, em nível histológico, empregando a seguinte técnica de análise:

- analisar qualitativamente e quantitativamente por meio de histomorfometria, utilizando microscopia óptica convencional, as reações inflamatórias do tecido periodontal, frente à movimentação dentária na presença de DM.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética

Esse trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista/UNESP Campus de São José dos Campos, cuja aprovação ocorreu em 14 de março de 2014 sob parecer nº 1/2014-PA/2014 (ANEXO A). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008.

4.2 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, albinos) do gênero masculino. Os animais tinham 90 dias de idade, pesando em média 300 g. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista, Campus São José dos Campos, em temperatura ambiente e em gaiolas plásticas específicas para este fim, na proporção de três animais por gaiola, forradas com raspa de madeira seca e esterilizada (maravalha de pinus), substituída diariamente, proporcionando as condições de higiene

necessárias ao bem-estar e à saúde dos animais. Os animais receberam suprimento constante de água potável e foram alimentados com dieta padrão, constituindo-se de ração moída (Guabi – Nutrilabor, Campinas, Brasil), fornecida *ad libitum*, assim como o fornecimento de água.

4.3 Distribuição da amostra

A amostra deste trabalho constituiu-se de 40 ratos avaliados durante a movimentação dentária nas variáveis: diabetes mellitus e doença periodontal.

Desta forma, temos a seguinte distribuição dos Grupos Experimentais (quadro) e o seguinte fluxograma (Figura 1):

Quadro - Distribuição dos grupos experimentais

GRUPO TESTE (n = 40) = Hemi-mandíbulas com Diabetes Mellitus		
D1	n = 10	Doença Periodontal
D2	n = 10	Movimentação Ortodôntica + Doença Periodontal
D3	n = 10	Movimentação Ortodôntica
D4	n = 10	Controle +
GRUPO CONTROLE (n = 40) = Hemi-mandíbulas normoglicêmicos		
ND1	n = 10	Doença Periodontal
ND2	n = 10	Movimentação Ortodôntica + Doença Periodontal
ND3	n = 10	Movimentação Ortodôntica
ND4	n = 10	Controle -

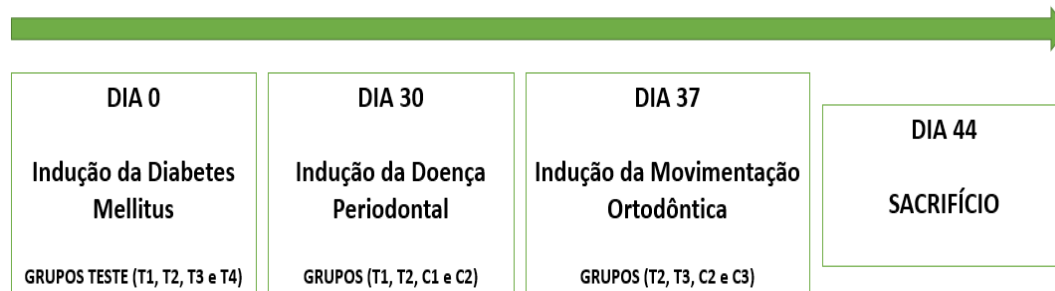


Figura 1 - Fluxograma do experimento

No delineamento do presente experimento, foram consideradas como variáveis experimentais, ou fatores em estudo, o tipo de Condição Sistêmica (ND = Não Diabético e D = Diabético), a Doença Periodontal (DP) e a Movimentação Ortodôntica (MO).

A unidade experimental foi o rato da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, albinos) do gênero masculino.

4.4 Indução da diabetes experimental

Para indução da DM experimental, foi realizada a diluição de aloxana monohidratada (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) em solução salina estéril, na concentração dose de 150 mg/peso em kg do rato. Essa diluição foi injetada via intraperitoneal (Figura 2). Após 12 horas da aplicação do medicamento, foi feita a administração de solução de glicose diluída em água na concentração de 10 % por kg do rato, para prevenção da hipoglicemia nos animais (de Amorim et al, 2008). Após 72 horas da administração da aloxana, foi coletada uma amostra de sangue da veia caudal dos animais para a avaliação da glicemia (Figura 3) com o

aparelho Accu-Chek Advantage (Boehringer Mannheim, ALE). Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia superior a 200 mg/dl. Essa medida foi repetida semanalmente, durante 3 semanas, para certificar que os animais permaneceram diabéticos. Os ratos que em qualquer período apresentaram glicemia inferior a 200 mg/dl, foram excluídos do estudo e substituídos por animais que novamente foram submetidos à indução da Diabetes.



Figura 2 - Injeção de aloxana via intraperitoneal para indução de Diabetes experimental

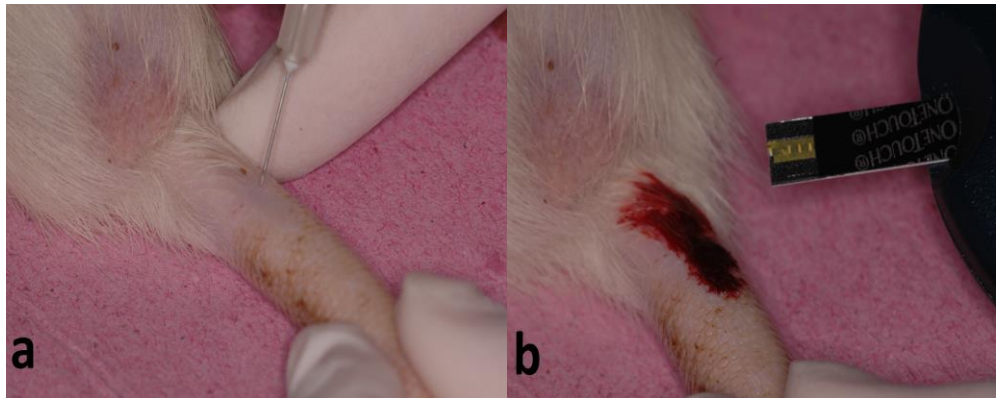


Figura 3 - Avaliação da glicemia obtida através de uma amostra de sangue da veia caudal. Local da punção (a) e obtenção da amostra (b)

4.5 Indução da Doença Periodontal

Após 30 dias da indução da DM, os animais dos grupos T2, T4, C2 e C4 receberam a indução da DP. Um único cirurgião experiente e treinado foi o responsável pela realização dos procedimentos. O mesmo estava cego para os grupos.

Para a realização dos procedimentos e eutanásia, os animais foram anestesiados com a mistura em iguais partes do anestésico Cloridrato de Quetamina, 100 mg/ml (Dopalen, da marca Vetbrands, Jacareí, Brasil) e o relaxante muscular Cloridrato de Xilazina, 20 mg/ml (Anasedan, da marca Vetbrands, Jacareí, Brasil) na dosagem de 1 ml/Kg, aplicados de forma intramuscular, com seringa de 1 ml e agulha de 12,7 mm estéril acoplada.

A ligadura para a indução de DP foi constituída de um fio de seda preto 3-0 colocado na região cervical do primeiro molar inferior,

tomando-se o cuidado de penetrar o fio no sulco gengival, portanto em íntima proximidade com tecidos gengivais, ficando o nó na região mesial (Figura 4).

A DP induzida por ligadura foi iniciada 7 dias antes da colocação do dispositivo ortodôntico, de acordo com um estudo de Holzhausen et al. (2002), que demonstrou que há perda de osso alveolar significativa após este período de indução da doença periodontal.



Figura 4 - Ligadura para a indução da doença periodontal

4.6 Instalação do dispositivo para a movimentação dentária

Após 7 dias de indução da DP, os animais foram novamente anestesiados para a indução da MO. Confirmada a perda de sentidos dos animais em decorrência da anestesia, foi realizado o posicionamento em uma mesa operatória para a instalação do dispositivo experimental realizada no mesmo dente que recebeu a ligadura para indução da doença periodontal. Para tal, foi utilizado um porta agulha Mathieu e afastando-se a mucosa jugal do rato com uma pinça clínica, foi inserida inicialmente por lingual e pelo espaço interproximal entre o primeiro e segundo molares inferiores esquerdos, a ponta de um segmento de fio de amarelo 0,10 mm, onde foi conectado uma mola de aço fechada de 5mm de comprimento.

O primeiro molar foi movimentado durante 7 dias, com uma mola de aço inoxidável fechada posicionada entre o primeiro molar (ponto de aplicação de força) e os incisivos inferiores (ponto de ancoragem), permitindo que o primeiro molar sofresse mesialização (Figura 5).

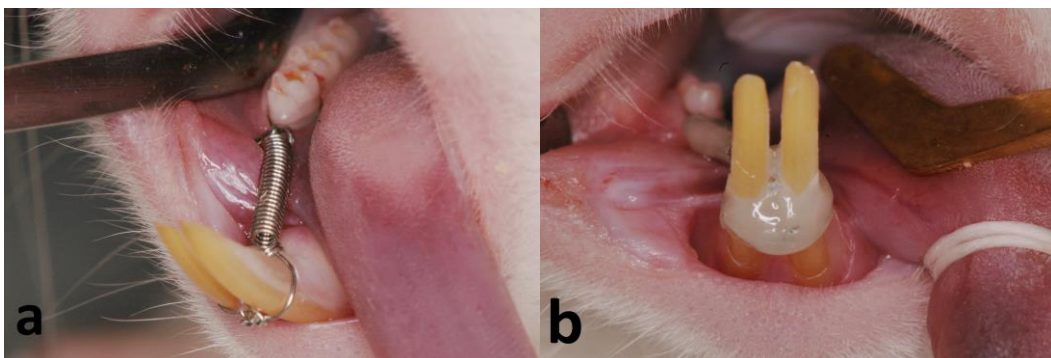


Figura 5 - Mola instalada entre o primeiro molar e os incisivos do rato (a). Resina composta, colocada ao redor dos fios ortodônticos para prevenir injúrias ao animal e manter o aparelho em posição (b)

4.7 Análise da movimentação ortodôntica

Ao término do período experimental, foi realizado o sacrifício dos animais com dose excessiva da mistura anestésica quetamina e xilazina. Logo após o sacrifício, foram realizadas as tomadas das medidas macro, utilizando um paquímetro e medindo a distância da mesial do primeiro molar inferior até a distal do segundo molar inferior.

4.8 Análise histológica

Após a dissecação das peças, as mandíbulas foram colocadas em solução tamponada de formaldeído a 10% para fixação, permanecendo nesta solução por 72 horas, em seguida, desmineralizadas em solução de EDTA.

As áreas de interesse foram incluídas em parafina e cortadas no sentido longitudinal para possibilitar a visualização das raízes e tecidos periodontais do primeiro molar inferior, onde houve a instalação do dispositivo experimental, e analisado o terço cervical onde os fenômenos inflamatórios e de reabsorção óssea são encontrados com maior exuberância. A contagem pela marcação de pontos foi realizada em 10 cortes por amostra, selecionados a cada 30 μm . Os cortes tiveram espessura de 4 μm e coloração pelo método hematoxilina-eosina.

Em todas as análises microscópicas qualitativas e quantitativas foram avaliados dez cortes histológicos semi sequenciais na região do osso alveolar do dente onde o dispositivo ortodôntico foi instalado, ou seja, dez cortes por animal.

4.9 Análise histomorfométrica

Um examinador cego e calibrado utilizou um sistema de análise de imagem (Image J), avaliando a área de furca nos dentes dos diferentes grupos (Figura 6).

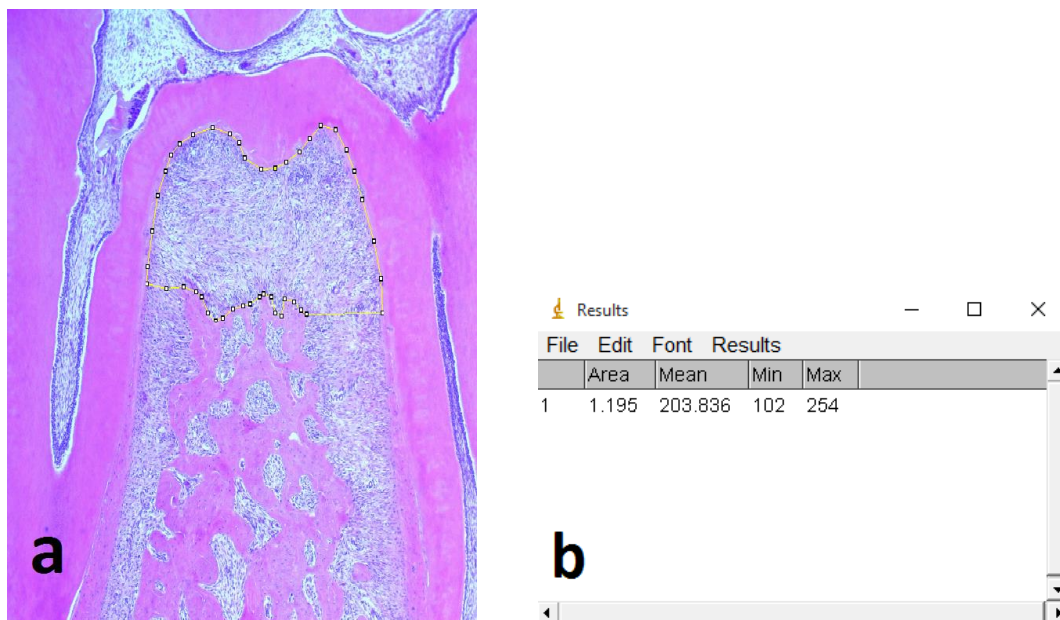


Figura 6 - Medição de área de perda óssea (mm^2) através do programa ImageJ (a) e resultados obtidos (b). O aumento utilizado foi 50x

As três variáveis em análise foram: valor de Perda Óssea (PO) medida através da área (mm^2) obtido pelo programa Image J 1.50b; Densidade Óssea (DO), medida através da porcentagem onde um total de 200 pontos representaram uma área de $1000 \mu\text{m}$ (% de osso lamelar), ou seja, quando maior a porcentagem de osso lamelar, menos denso era o osso, e Quantidade de Movimentação Ortodôntica (QM) (mm), medida através de um parquímetro, no momento do sacrifício do animal.

A região avaliada representou a área da furca, onde foi analisada a PO e a DO para os dentes com e sem ligaduras. Além disso, cinco seções igualmente distantes foram avaliadas quanto a DO (proporção de tecido ósseo mineralizado em uma zona de $1.000 \mu\text{m}$ sob a bifurcação) na área inter-radicular dentária (Figura 7).

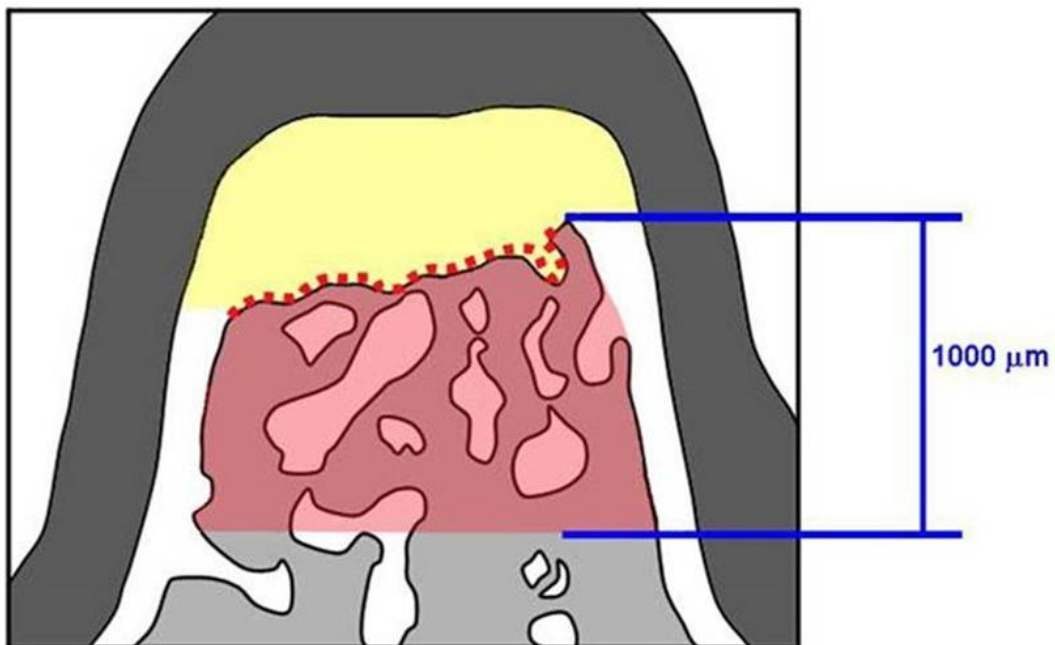


Figura 7 - Ilustração das regiões para análise histomorfométrica incluindo a perda óssea e a densidade óssea.

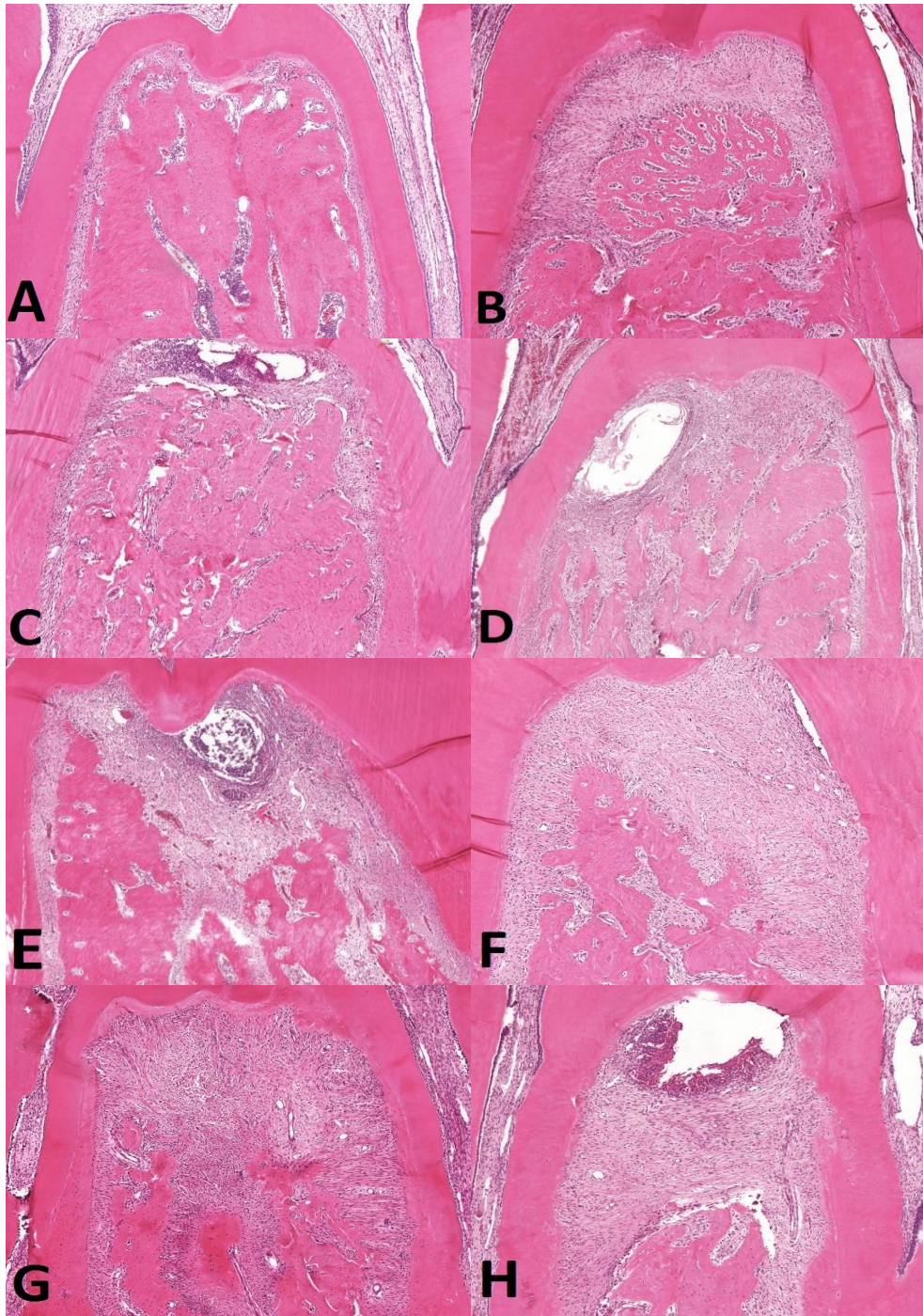


Figura 8 - Lâminas com coloração hematoxilina-eosina das regiões de furca para visualização da perda óssea e qualidade óssea. Na coluna da esquerda, visualiza-se o grupo controle e na coluna da direita, o grupo teste. A sequência é: controle +; movimentação ortodôntica; doença periodontal; doença periodontal + movimentação ortodôntica

4.10 Análise estatística

Obtidas as informações desejadas, uma análise exploratória foi realizada em cada uma das variáveis em análise para determinar o teste estatístico adequado. Os dados foram submetidos, então, a análise estatística por meio dos programas computacionais: GraphPad Prism (GraphPad Software, version 6.01, 2012); Minitab (Minitab, version 17.1, 2013) e Statistix (Analytical Software Inc., version 9.0, 2013).

Todas as análises foram efetuadas por um pesquisador experiente e calibrado, sem conhecimento prévio do grupo que estava sendo avaliado. A estatística descritiva consistiu no cálculo de médias e desvio padrão. Já a estatística inferencial foi realizada por meio de análise de variância: em PO, para análise intragrupo, foi realizado o teste de Mann-Whitney; em DO, para análise intragrupo foi realizado o teste ANOVA e para análise intergrupo, o teste de Tukey, com nível de significância de 5 %; em QM, para análise foi realizado o teste ANOVA e para análise intergrupo, o teste de Tukey, com nível de significância de 5 %.

5 RESULTADOS

5.1 Quantidade de movimentação dentária

A estatística descritiva (média \pm desvio padrão) dos dados obtidos em relação a quantidade de movimentação dentária sob diferentes CS, de MO e DP, são apresentados por meio da tabela 1, conforme mostrado a seguir.

Tabela 1 – Média e desvio padrão da quantidade de movimentação dentária (mm)

CS	Controle +	DP	MO	MO+DP
ND	6,88 +- 0,16	7,07 +- 0,20	6,97 +- 0,20	7,41 +- 0,29
D	6,99 +- 0,24	7,11 +- 0,19	7,04 +- 0,21	7,50 +- 0,40

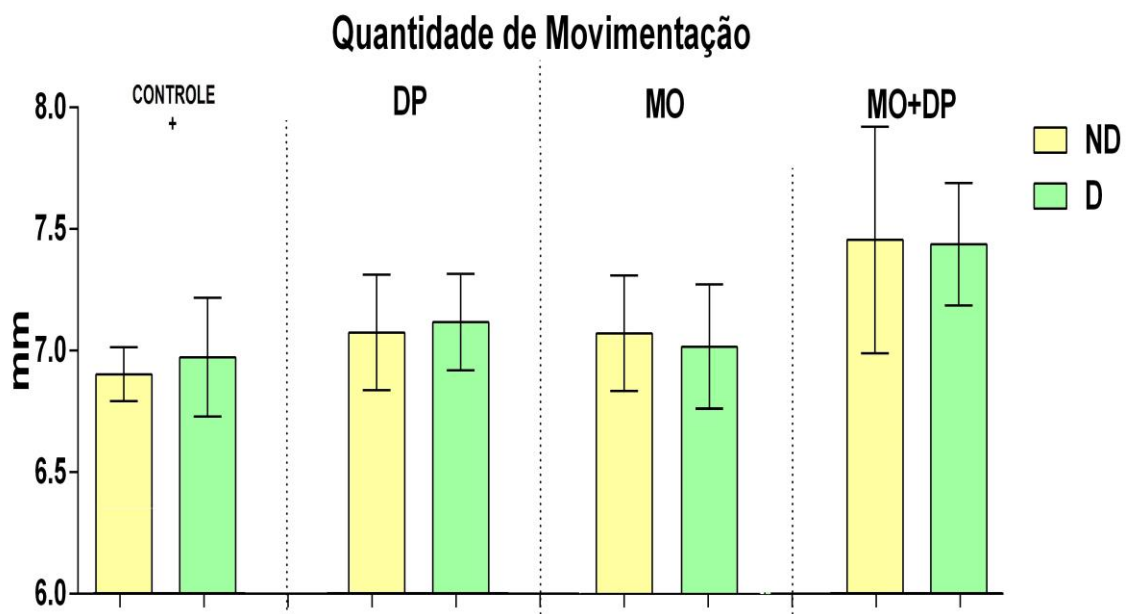


Figura 9 - Gráfico de colunas (média \pm desvio padrão) obtidos em cada tipo de condição experimental em relação a quantidade de movimentação dentária.

Ao analisar a tabela 1 e a figura 9, nota-se que as diferenças entre a quantidade de movimentação dentária nos grupos experimentais não são estatisticamente significativas, mesmo quando se compara animais com DM e animais sem DM.

Nota-se também que quando se associa a DP com a MO, há uma maior movimentação dentária, mostrando que a associação entre a DP e a MO potencializa a movimentação.

5.2 Perda óssea

A estatística descritiva (média \pm desvio padrão) dos dados obtidos em relação a perda óssea (PO) na área de furca sob diferentes condições sistêmicas (CS), são apresentados por meio da tabela 2, conforme mostrado a seguir.

Tabela 2 – Média e desvio padrão da perda óssea (mm²)

CS	Controle +/-	DP*	MO	MO+DP*
ND	0,10 \pm 0,02	0,70 \pm 0,35	0,20 \pm 0,08	0,79 \pm 0,28
D	0,25 \pm 0,30	1,37 \pm 0,51	0,41 \pm 0,22	2,77 \pm 0,64

*p<0,05

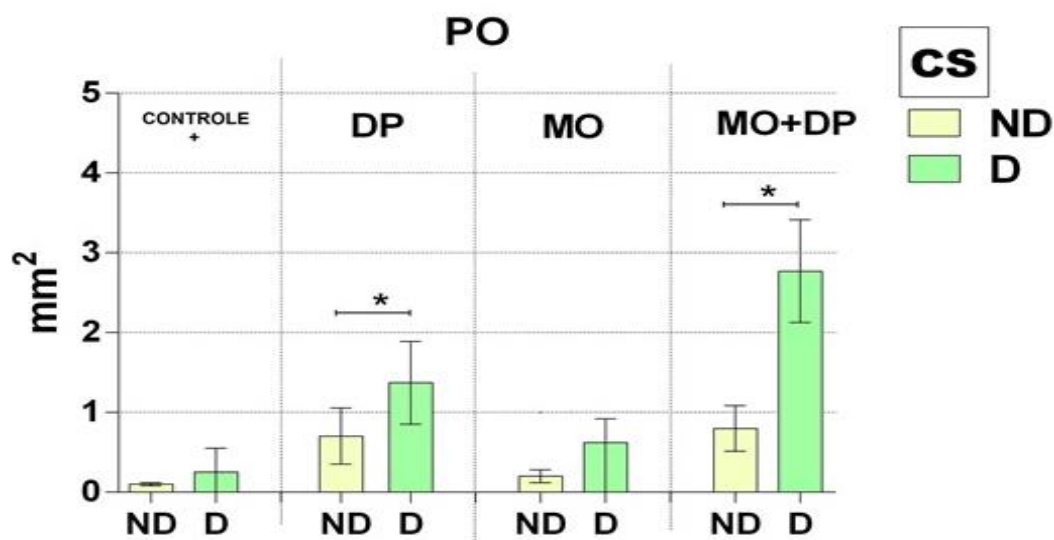


Figura 10 - Gráfico de colunas (média \pm desvio padrão) obtidos em cada tipo de condição experimental em relação a perda óssea

Analisando a tabela 2 e a figura 10, observa-se que há uma influência estatisticamente significativa da DM, principalmente quando associada à DP e MO, quando comparada à presença de DP e MO em animais normoglicêmicos, ou seja, sem DM.

Nota-se também, que a PO é bastante avançada quando há uma conjunção dos fatores DP e MO, principalmente na presença de DM. Porém, também pode ser verificada que a DP leva a uma PO maior em animais normoglicêmicos do que apenas a MO em animais diabéticos.

5.3 Densidade óssea

A estatística descritiva (média \pm desvio padrão) dos dados obtidos em relação a densidade óssea (DO) sob diferentes CS, de MO e DP, são apresentados por meio da tabela 3, conforme mostrado a seguir.

Tabela 3 – Média e desvio padrão da densidade óssea (%)

CS	Controle +	DP	MO	MO+DP*
ND	21,91 +- 5,44	32,81 +- 8,19	26,44 +- 7,48	27,74 +- 10,22
D	17,87 +- 3,69	31,12 +- 10,42	24,97 +- 5,31	39,03 +- 8,09

*p<0,05

O teste de comparação múltipla de Tukey (5%) foi efetuado na comparação das oito médias referente às condições experimentais. Obteve-se, então, grupos de mesmo desempenho em termos de DO, tabela 5.

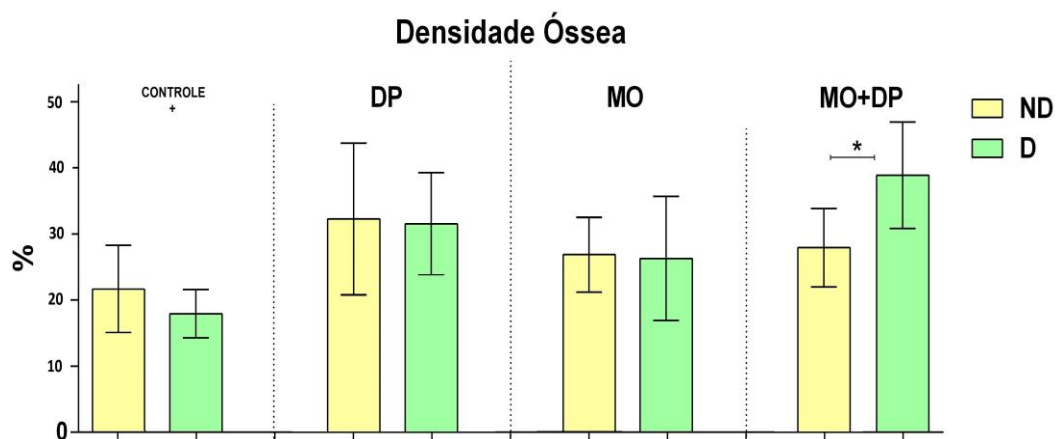


Figura 11 - Gráfico de colunas (média \pm desvio padrão) obtidos em cada tipo de condição experimental em relação a densidade óssea

Para avaliar o relacionamento entre a CS, a DP e a MO, os dados obtidos através do experimento foram submetidos ao modelo estatístico da análise de variância, após serem avaliadas as suposições do modelo de análise de variância.

Os valores resíduos, decorrentes do ajuste do modelo adotado, foram examinados para avaliar a adequabilidade do modelo para válidas inferências estatísticas e foi determinado que os dados originais propiciaram um ajuste adequado, porque os valores residuais se ajustam a uma distribuição normal de probabilidade (pelo teste de Ryan-Joner).

Analisando a tabela 3 e a figura 11, nota-se que há uma pequena diferença em relação a DO quando comparados os animais com DM e animais sem DM. Inclusive, em animais não diabéticos se nota a presença de um osso menos denso, quando comparado a animais diabéticos. Porém, não são diferenças estatisticamente significativas. Essa perspectiva se inverte apenas quando se relaciona a MO à DP, onde se pode verificar que a DO é menor em animais com DM.

Ao analisar a tabela 5, nota-se que, em geral, as diferenças não são estatisticamente significantes quando comparadas entre si. Esse fato difere apenas entre animais diabéticos e não diabéticos quando se relaciona a MO à DP.

6 DISCUSSÃO

A Diabetes Mellitus (DM) é uma das doenças de maior importância na saúde pública atual, visto que milhares de indivíduos são portadores da doença. Do mesmo modo, a prevalência de Doença Periodontal (DP) na população mundial é alta e, na presença de DM, a DP torna-se mais severa e frequente (Löe, 1993). Soma-se a isso, o fato de que a expectativa de vida da população tem aumentado, bem como a procura por procedimentos odontológicos restauradores e estéticos. O presente estudo teve como objetivo, avaliar a influência da DM na movimentação ortodôntica (MO) quando associada à DP em modelo experimental em ratos Wistar.

A escolha do rato baseou-se no fato de que esses animais são empregados com maior frequência nos modelos experimentais de movimentação dentária induzida, por se tratar de um modelo já consagrado em função do baixo custo, facilidade de armazenamento e boa disponibilidade (Kalu et al., 1989). Além disso, a composição e estrutura dos tecidos periodontais dos molares dos ratos é muito semelhante à de humanos (Yang et al., 2013). O modelo experimental abortado afeta o tecido local (Çalisir et al., 2015), induzindo à DP.

Já em relação a aloxana, a escolha se deu por seu uso ser amplamente difundido na produção de diabetes experimental. Sua ação diabetogênica caracteriza-se principalmente pela produção de radicais livres através de sua redução e subsequente formação de radicais superóxidos, que são altamente reativos e destroem seletivamente as células pancreáticas produtoras de insulina nas ilhotas de Langerhans. O modelo utilizado no presente estudo induziu a DM tipo 1.

No modelo experimental de indução de DM por aloxana utilizado no presente estudo, observou-se que os ratos com glicemia maior que 200 mg/dL, apresentavam grande perda de peso do momento da indução até o sacrifício, quando comparados com ratos normoglicêmicos. Em estudo realizado por Diniz et al (2008), em modelo experimental semelhante, não houve diferença no peso entre animais diabéticos e normoglicêmicos (Nagem, 2006).

Em um estudo de Giglio e Lama (2001), onde foram estudados os efeitos da DM experimental em ratos, foi observado que os animais diabéticos apresentaram diminuição do peso corporal. O presente estudo corrobora esses fatos. Além disso, os ratos diabéticos necessitam de mais tempo para concluir as alterações em níveis de colágeno envolvidos na remodelação do ligamento periodontal, quando comparados a ratos não diabéticos (Zhang et al., 2011) e também apresentam uma reação inflamatória maior e mais persistente (Kubota et al., 2008).

O osso é um tecido que sofre remodelação constante como um resultado da reabsorção óssea e formação de osso novo (Krishnan, Davidovitch, 2006; Wise, King, 2008; Braga et al., 2011). Esses processos podem ser afetados pela diabetes (Räkel et al., 2008; He et al., 2004; Mishima et al., 2002). Como a movimentação ortodôntica depende de remodelação óssea alveolar equilibrada (Wise, King, 2008; Braga et al., 2011), pode-se supor que a diabetes afeta este processo.

A técnica de movimentação dentária experimental estabelecida para o presente estudo, já foi provada ser eficaz e viável por diversos estudos (King et al., 1991; Leiker et al., 1995; Rody et al., 2001). Estudos demonstraram que um nível de força entre 40-60 g estimula uma movimentação dentária substancial em molares de ratos (King et al., 1991; Chen et al., 2015). No presente estudo, foi utilizado um nível de força de 60 g.

Um estudo de Lin et al. (2010), afirma que a reabsorção óssea rápida e destruição do ligamento periodontal são características apresentadas quando é feita a MO em animais diabéticos, fato confirmado pelo presente estudo. Em animais saudáveis, a reabsorção óssea ocorre quando é feita uma movimentação ortodôntica adequada, sendo logo substituída pela remodelação óssea. Já em animais diabéticos, a quantidade de osteoclastos é mantida por mais tempo, levando a uma destruição óssea mais prolongada.

Na MO, a reabsorção óssea e a formação de osso novo e a degradação e remodelação do ligamento periodontal são processos chaves. O estudo de Lin et al. (2010) mostra que a DM afeta esses processos prolongando-os, comprometendo a recuperação dos danos causados pelo estresse ortodôntico. Os resultados de perda óssea e densidade óssea confirmam esses dados.

O modelo de ligadura para indução da DP mostrou-se efetivo, com extensa perda óssea na área de furca e na distal do primeiro molar e perda de osso de suporte. O presente estudo reafirma o sucesso desse modelo, mostrado nos estudos de Moraes et al. (2015) e Oliveira et al. (2015). Além disso, as alterações nos tecidos periodontais após a colocação das ligaduras em ratos são semelhantes aos observados em DP em humanos, envolvendo ruptura e migração apical do epitélio juncional, aumento do número de células inflamatórias no tecido conjuntivo, perda de fibras do ligamento periodontal e reabsorção óssea (Bezerra et al., 2002; Duarte et al., 2010; de Molon, 2013).

O estudo de Yang et al. (2013), mostra que o processo da movimentação ortodôntica agrava a resposta inflamatória do tecido periodontal e induz uma inflamação maior, levando a uma extensa destruição do periodonto. O presente estudo confirma esses dados, já que

nos grupos onde se associou a DP à MO, foi verificado uma maior perda óssea e maior mobilidade dentária no momento do sacrifício.

Os resultados do presente estudo mostram uma perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior maior em animais diabéticos quando comparados aos animais não diabéticos. Diversos estudos corroboram com esses resultados, comprovando que ratos portadores de diabetes experimental mostram uma reparação óssea mais lenta após a movimentação ortodôntica (Hotgrave, Donath, 1989; Lin et al., 2010) e, quando se trata de DP, a hiperglicemia característica inibe a proliferação e diferenciação dos fibroblastos, que contribui para uma reparação periodontal mais lenta (Lin et al., 2010; Willershausen et al., 1991; Kim et al., 2006), além de haver uma importante relação entre a hiperglicemia e a resposta imune e a inflamação (Kubota et al., 2008; Silva et al., 2008).

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através desse estudo mostram que a DM tem efeitos deletérios, principalmente quando se trata da perda óssea e densidade óssea na região de furca. Esses efeitos se maximizam quando a DM é associada à doença periodontal e a movimentação ortodôntica.

Mais estudos são necessários para elucidar de que maneira a DM age em indivíduos com doença periodontal e tratamento ortodôntico.

5 REFERÊNCIAS *

Albandar JM, Tinoco EM. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontol 2000* 2002;29:153–76.

Al-Mashat HA, Kandru S, Liu R, Behl Y, Desta T, Graves DT. Diabetes enhances mRNA levels of proapoptotic genes and caspase activity, which contribute to impaired healing. *Diabetes* 2006 Feb;55:487-95.

American Academy of Periodontology. Diabetes and periodontal diseases (position paper). *J Periodontol* 1996 Feb; 67 (2):166-76.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2009 Jan;32 Suppl 1:S62–7. doi: 10.2337/dc09-S062.

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

Bezerra MM, Brito GA, Ribeiro RA, Rocha FA. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2002 May;35(5):613–6

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

Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*. 2010 Apr;464(7293):1293–300.

Borrell LN, Papapanou PN. Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:132–58.

Braga SMG, Taddei SR, Andrade I Jr, Queiroz-Junior CM, Garlet GP, Repeke CE, et al. Effect of diabetes on orthodontic tooth movement in a mouse model. *Eur J Oral Sci*. 2011 Feb;119(1):7–14. doi: 10.1111/j.1600-0722.2010.00793.x

Bullon P, Newman HN, Battino M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontol* 2000. 2014 Feb;64(1):139–153. doi: 10.1111/j.1600-0757.2012.00455.x.

Çalisir M, Akpınar A, Poyraz Ö, Göze F et al. The histopathological and morphometric investigation of the effects of systemically administered humic acid on alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2015 Nov 7. doi: 10.1111/jre.12329.

Chapple IL, Genco R. Working group 2 of the joint EFP/AAP workshop. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*. 2013 Apr;84(4 Suppl):S106-12. doi: 10.1902/jop.2013.1340011.

Chen Y, Wang XX, Zhao BJ, Bu J, Su YR, Zhang J. Effects of icarrin on orthodontic tooth movement in rats. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Jun 15;8(6):8608-16.

de Amorim FP, Ornelas SS, Diniz SF, Batista AC, da Silva TA. Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetic rats. *J Mol Histol.* 2008;39(4):401-8. doi: 10.1007/s10735-008-9178-x.

de Molon RS, de Avila ED, Cirelli JA. Host responses induced by different animal models of periodontal disease: a literature review. *J Investig Clin Dent.* 2013 Nov(4):211–8. doi: 10.1111/jicd.12018.

Diniz SF, Amorim FP, Cavalcante-Neto FF, Bocca AL, Batista AC, Simm GE et al. Alloxan-induced diabetes delays repair in a rat model of closed tibial fracture. *Braz J Med Biol Res.* 2008 May;41(5):373.

Duarte PM, Tezolin KR, Figueiredo LC, Feres M, Bastos MF. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2010 Feb;55(2):142–7. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.10.006.

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of *Diabetes Mellitus*. American Diabetes Association: clinical practice recommendations 2002. *Diabetes Care.* 2002 Jan; 25(Suppl.1): S1-147

Falanga, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet.* 2005 Nov 12; 366(9498):1736-43.

Fujii H, Hamada Y, Fukagawa M. Bone formation in spontaneously diabetic Torii-newly established model of non-obese type 2 diabetes rats. *Bone.* 2008 Feb;42(2):372-9.

Galkowska H, Wojewodzka U, Olszewski WL. Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen.* 2006 Sep-Oct; 14(5):558-65.

Giglio MJ, Lama MA. Effect of experimental diabetes on mandible growth in rats. *Eur J Oral Sci* 2001 Jun;109(3):193–7.

Graves DT, Li J, Cochran DL. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res.* 2011;90(2):143–53. doi: 10.1177/0022034510385236.

He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology* 2004 Jan;145(1):447-52.

Heap J, Murray MA, Miller SC, Jalili T, Moyer-Mileur LJ. Alterations in bone characteristics associated with glycemic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr.* 2004 Jan;144(1):56-62

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

Holtgrave EA, Donath K. Periodontal reactions to orthodontic forces in the diabetic metabolic state. *Fortschr Kieferorthop* 1989 Aug;50:326-37.

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

Hui SL, Epstein S, Johnston CC Jr. A prospective study of bone mass in patient with type I diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1985 Jan;60(1):74-80.

Inoue H, Shinohara M, Ohura K. The effect of leukocyte function of streptozotocin-induced diabetes in naturally occurring gingivitis rat. *J Osaka Dent Univ* 1997; 31:47-54.

Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology*. 1989 Jan;124(1):7-16.

Katagiri S, Nagasawa T, Kobayashi H, Takamatsu H, Bharti P, Izumiyama H et al. Improvement of glycemic control after periodontal treatment by resolving gingival inflammation in type 2 diabetic patients with periodontal disease. *J Diabetes Investig*. 2012 Aug 20;3(4):402–409. doi: 10.1111/j.2040-1124.2012.00209.x.

Kim HS, Park JW, Yeo SI, Choi BJ, Suh JY: Effects of high glucose on cellular activity of periodontal ligament cells in vitro. *Diabetes Res Clin Pract*. 2006 Oct; 74 (1):41–7.

King GJ, Keeling SD, McCoy EA, Ward TH. Measuring dental drift and orthodontic tooth movement in response to various initial forces in adult rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1991 May 99(5):456–65.

Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, Rao DS, Whitehouse FW, Parfitt AM. Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes* 1995 Jul;44(7):775-82.

Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006 Apr;129:469.e1-32.

Kubota T, Itagaki M, Hoshino C, Nagata M, Morozumi T, Kobayashi T et al. Altered gene expression levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in periodontitis-affected gingival tissue. *J Periodontol*. 2008;79(1):166–73. doi: 10.1902/jop.2008.070159.

Lamster IB, Lalla E, Borgnakke WS, Taylor GW. The relationship between oral health and diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc*. 2008 Oct; 139 Suppl:19S-24S.

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

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 Oct;108(4):380–8.

Li X, Zhang L, Wang N, Feng X, Bi L.. Periodontal ligament remodeling and alveolar bone resorption during orthodontic tooth movement in rats with diabetes. *Diabetes Technol Ther*. 2010 Jan;12(1):65-73. doi: 10.1089/dia.2009.0085.

Loder RT. The influence of diabetes on the healing of closed fractures. Clin Orthop Relat Res. 1988 Jul;(232):210–6.

Löe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. Diabetes Care 1993 Jan;16(1):329–34.

Mattila TK, de Boer A. Influence of intensive versus conventional glucose control on microvascular and macrovascular complications in type 1 and 2 diabetes mellitus. Drugs 2010 Dec;70(17):2229-45. doi: 10.2165/11585220-000000000-00000.

Mishima N, Sahara N, Shirakawa M, Ozawa H. Effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on alveolar bone deposition in the rat. Arch Oral Biol 2002 Dec;47:843–9.

Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. J Periodontol. 2014 Mar;85(3):465-77. doi: 10.1902/jop.2013.130225.

Moraes RM, Lima GMG, Oliveira FE et al. Exenatide and Sitagliptin Decrease the Expression of *Il1b*, *Mmp9* and *Nos2*, but Does not Reduce Alveolar Bone Loss in Rats With Periodontitis. Periodontol. 2015 Nov;86(11):1287-95. doi: 10.1902/jop.2015.150278.

Nagem, TJ. Aloxano e diabetes. Rev Bras Toxicol. 2006;19(2):81-7.

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

Oliveira GJ, Paula LG, Souza JA, Spin-Neto R, Stavropoulos A, Marcantonio RA. Effect of avocado /soybean unsaponifiables on ligature-induced bone loss and bone repair after ligature removal in rats. *J Periodontal Res.* 2015 Aug. doi: 10.1111/jre.12312.

Perinetti G et al. Alkaline phosphatase activity in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2002 Nov; 122(5):548-56.

Preshaw PM, Bissett SM. Periodontitis: oral complication of diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2013 Dec;42(4):849–67. doi: 10.1016/j.ecl.2013.05.012.

Räkel A, Sheehy O, Rahme E, Lelorier J. Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2008 Jun;34:193–205. doi: 10.1016/j.diabet.2007.10.008.

Reichert C, Deschner J, Jäger A. Influence of diabetes mellitus on the development and treatment of malocclusions – a case report with literature review. *J Orofac Orthop.* 2009 Mar;70(2):160–75. doi: 10.1007/s00056-009-0819-9.

Rody WJ Jr, King GJ, Gu G. Osteoclast recruitment to sites of compression in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001; 120(5):477–89

Rosenbloom AL. Skeletal and joint manifestations of childhood diabetes. *Pediatr Clin North Am* 1984 Jun;31(3):569-89.

Roy S, Sato T, Paryani G, Kao R. Downregulation of fibronectin overexpression reduces basement membrane thickening and vascular lesions in retinas of galactose-fed rats. *Diabetes*. 2003 May;52(5):1229-34.

Ryan ME, Carnu O, Kamer A. The influence of diabetes on the periodontal tissues. *J Am Dent Assoc*. 2003 Oct;134Spec No:34S–40S.

Saito M, Fujii K, Mori Y, Marumo K. Role of collagen enzymatic and glycation induced crosslinks as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporos Int* 2006 Oct;17(10):1514–23.

Selby PL. Osteopenia and diabetes. *Diabet Med*. 1988 Jul-Aug;5(5):423-8.

Silva JA, Lorencini M, Peroni LA, De La Hoz CL, Carvalho HF, Stach-Machado DR. The influence of type I diabetes mellitus on the expression and activity of gelatinases (matrix metalloproteinases-2 and -9) in induced periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2008 Feb;43(1):48–54. doi: 10.1111/j.1600-0765.2007.00993.x.

Soltesz G, Patterson CC, Dahlquist G et al. Worldwide childhood type 1 diabetes incidence—what can we learn from epidemiology? *Pediatr Diabetes*. 2007 Oct;8 Suppl 6:6-14.

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

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

Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2002;30(3):182–92.

Valkusz Z [Diabetes and osteoporosis.] *Orv Hetil.* 2011 Jul 17;152(29):1161–6. doi: 10.1556/OH.2011.29154.

Villarino ME, Lewicki M, Ubios AM. Bone response to orthodontic forces in diabetic Wistar rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011 Apr;139(4 Suppl):S76-82. doi: 10.1016/j.ajodo.2010.06.021.

Willershausen-Zonnchen B, Lemmen C, Hamm G: Influence of high glucose concentrations on glycosaminoglycan and collagen synthesis in cultured human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol.* 1991 Mar;18(3):190–5.

Wise GE, King GJ. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2008 May;87(5):414–34.

Wiske PS, Wentworth SM, Norton JA Jr., Epstein S, Johnston CC Jr. Evaluation of bone mass and growth in young diabetics. *Metabolism.* 1982 Aug;31(8):848-54.

Wu YY, Xiao E, Graves DT Diabetes mellitus related bone metabolism and periodontal disease.. *Int Oral Sci.* 2015 Jun 26;7,63–72. doi: 10.1038/ijos.2015.2.

Yang JH, Li ZC, Kong WD, Zhang W, Jia YP, Zhang YL et al. Effect of orthodontic force on inflammatory periodontal tissue remodeling and expression of IL-6 and IL-8 in rats. *Asian Pac Trop Med*. 2013 Oct;6(10):757-61. doi: 10.1016/S1995-7645(13)60133-9.

Zhang L, Li X, Bi L-J. Alterations of collagen-I, MMP-1 and TIMP-1 in the periodontal ligament of diabetic rats under mechanical stress. *J Periodont Res*. 2011 Aug (4);46:448–55. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01359.x.

Zimmet P, Alberti KGMM, Shaw J. Global and Societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):782-7.

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



Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028
Fax (12) 3947-9010 / tango@fosjc.unesp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA



CERTIFICADO CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

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

São José dos Campos, 14 de março de 2014.

Prof.Assist.Dr. RUBENS NISIE TANGO
Coordenador

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

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