



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

VILANA MARIA ADRIANO ARAÚJO

**A ATORVASTATINA E O ALENDRONATO INTERFEREM NA MOVIMENTAÇÃO
DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS VIA REDUÇÃO DAS ATIVIDADES
INFLAMATÓRIA E REABSORTIVA E AUMENTO DO ANABOLISMO ÓSSEO**

FORTALEZA

2015

VILANA MARIA ADRIANO ARAÚJO

A ATORVASTATINA E O ALENDRONATO INTERFEREM NA MOVIMENTAÇÃO
DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS VIA REDUÇÃO DAS ATIVIDADES
INFLAMATÓRIA E REABSORTIVA E AUMENTO DO ANABOLISMO ÓSSEO

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Vilma de Lima

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- A692a Araújo, Vilana Maria Adriano.
A atorvastatina e o alendronato interferem na movimentação dentária induzida em ratos via redução das atividades inflamatória e reabsortiva e aumento do anabolismo ósseo/ Vilana Maria Adriano Araújo. – Fortaleza, 2015.
111 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2015.
Área de concentração: Farmacologia.
Orientação: Profa. Dra. Vilma de Lima.
1. Movimentação Dentária. 2. Hipolipemiantes. 3. Alendronato. 4. Remodelação Óssea. 5. Ratos. I. Lima, Vilma de (Orient.). II. Título.

CDD 615.1

VILANA MARIA ADRIANO ARAÚJO

A ATORVASTATINA E O ALENDRONATO INTERFEREM NA MOVIMENTAÇÃO
DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS VIA REDUÇÃO DAS ATIVIDADES
INFLAMATÓRIA E REABSORTIVA E AUMENTO DO ANABOLISMO ÓSSEO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em 16 de dezembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Vilma de Lima (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha
Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior
Universidade Federal do Ceará

*Aos meus pais, Vilmar e Elivanda, por
todo o apoio e amor incondicionais.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Vilma Lima, por ter acreditado em meu potencial e me encorajado incessantemente a persistir. Esses sete anos de convívio foram imprescindíveis para minha formação acadêmica e profissional. Serei sempre grata por sua compreensão, paciência, ensinamentos e conselhos, os quais foram primordiais na concretização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Ribeiro (*in memoriam*), pelo apoio técnico e científico. Seus ensinamentos nunca serão esquecidos e sempre será lembrado por sua determinação e integridade.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Prof. Dra. Geanne Matos, pela dedicação e por sua ótima atuação frente à coordenação.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina (UFC), pela contribuição na minha formação profissional e pelos conhecimentos científicos transmitidos de forma exemplar.

Aos professores participantes da comissão avaliadora desta dissertação, os doutores Fernando de Queiroz Cunha e Roberto César Pereira Lima Júnior, pela dedicação no aprimoramento deste trabalho.

À pós-doutoranda Deisy Viviana Tenazoa Wong, pela disponibilidade e auxílio na dosagem de citocinas realizadas neste trabalho.

À doutoranda Iracema Matos Melo, por estar sempre presente, pela parceria e amizade. Sua ajuda foi indispensável para a concretização deste estudo.

À mestranda Bianca Moreira Kurita, pela colaboração, incentivo e companheirismo.

Aos colegas e pós-graduandos, José Carlos Ribeiro, Karinn Soares Araújo, Ana Patrícia Souza de Lima Alcântara, Mariana Vasconcelos Guimarães, Rafael Ribeiro Reis, Fabiana Paim Cardoso, pela assistência nos experimentos e pelos momentos de descontração e científicos inesquecíveis compartilhados.

Aos estudantes de iniciação científica: Tereza Cristina Marques Forte, Marina Fiuza Sarte e Edgar Maia Lassance Cunha Neto, pelo esforço, dedicação, confiança e pelo compromisso com a pesquisa e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos monitores da disciplina de Farmacologia para Odontologia, pelo compartilhamento de conhecimentos e experiências importantes para a prática docente.

À minha turma de Pós-Graduação, pelo ótimo convívio no decorrer desses dois anos e meio.

Aos funcionários técnicos administrativos da Universidade Federal do Ceará e prestadores de serviços Alceu Machado de Sousa, Laura Alves de Souza, Célia A. de Carvalho, Alana Carvalho Bezerra Viana, Naiara Felipe Alves, Maria Silvandira França Pinheiro, Adaulto Rodrigues de Sousa e Gabriela Mariangela Farias de Oliveira pela atenção e suporte no decorrer desta etapa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio científico, suporte financeiro e a concessão de uma bolsa de estudo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, por toda a força, pelas bênçãos derramadas sobre minha vida e por ter me amparado em todos os momentos de angústia, preocupações e tristezas.

Aos meus pais, José Vilmar Araújo e Antônia Elivanda Adriano Araújo, pelo apoio e pelos valores imensuráveis que me foram transmitidos.

Aos meus irmãos, José Vilmar Araújo Júnior e Luana Adriano Araújo, por terem sido verdadeiros companheiros e amigos em toda a minha trajetória.

Aos meus avós, Manoel Messias Adriano, Maria Cleonice Adriano, João Osmar Araújo (*in memoriam*) e Maria Estrela Medeiros, os quais estão intercedendo a Deus por mim e por minhas vitórias.

Ao meu namorado, João Eudes Teixeira Pinho Filho, com quem pude compartilhar minhas preocupações e quem me ajudou a superar as barreiras do dia-a-dia, estimulando o meu crescimento profissional; e à sua família, pelo apoio e acolhimento.

Às minhas amigas, Mariana Lima, Karine Tomaz, Nádia Dantas, Luana Araújo, Ilanna Andrade, Ilanna Estanislau, Suellen Rocha, Janaína Fernandes, pela amizade verdadeira. Vocês me apoiaram e estiveram sempre presentes nos momentos de alegrias, vitórias e tristezas.

Às minhas eternas companheiras, Milena Diógenes, Priscila Lucena e Janeiline Carneiro. Obrigada por me darem a oportunidade do convívio com pessoas tão maravilhosas. Vocês estão guardadas no meu coração para sempre.

Às amigas Thyanne Brasil Barbosa, Iracema Matos Melo e Bianca Moreira Kurita, amigas que colaboraram com o meu amadurecimento pessoal e com quem pude compartilhar experiências, conhecimentos, dúvidas e anseios. Obrigada pelas conversas, pelas risadas e por estarem presente na minha vida. Sem vocês, a pós-graduação não teria sido a mesma.

RESUMO

A movimentação dentária induzida (MDI) envolve processos inflamatórios e de remodelação óssea nos sítios de compressão e tração. Durante o tratamento ortodôntico, fármacos podem modular a taxa de movimentação. Nesse contexto, investigou-se a atorvastatina (ATV), o alendronato (ALD) ou sua combinação (ATV+ALD) na MDI em ratos. Inicialmente, grupos de 6 animais com MDI foram eutanasiados na 6ª h e nos dias 1, 4, 7, 11, 14 e 21, e tiveram suas hemimaxilas analisadas quanto a distância entre molares e incisivos, histomorfometria do ligamento periodontal (LP) das raízes distovestibular, distolingual e intermediária, e atividade de mieloperoxidase (MPO; $\text{U} \times 10^3/\text{mg}$ de gengiva). Para a abordagem farmacológica, os animais durante 28 d receberam por gavagem água destilada (H_2O_d ; 2 ml/kg/d), ATV (1, 3 e 9 mg/kg/d), ALD (1 e 7 mg/kg/sem) ou combinação de suas menores doses (ATV+ALD), sendo 11 d antes da eutanásia, submetidos à MDI. Foram avaliados além da distância entre molares e incisivos, a histomorfometria e MPO, os níveis de IL-1 β (pg/mg de gengiva), imunomarcações para RANKL, OPG e TRAP, e níveis séricos de fosfatase alcalina óssea (FAO; U/l); (Comissão de Ética em Pesquisa Animal-UFC nº 21/14). O curso temporal evidenciou redução da distância entre molares e incisivos, tornando-se significativa a partir do 11º d em relação ao 1º d. No lado de compressão, observou-se redução significativa do LP e aumento de áreas hialinas, e no lado de tração, na 6ª h e nos 1º e 4º d. O LP retornou à normalidade a partir do 7º d e as áreas hialinas desapareceram no 14º d. Observou-se pico de MPO entre a 6ª h e 1º d, reduzindo-se a partir do 4º até 21º d. Nos grupos de animais não tratados e com 11 d de MDI apresentaram redução da distância entre molares e incisivos, intensas reabsorções óssea e radicular, formação de áreas hialinas no LP, aumento de MPO e dos níveis de IL-1 β , maior imunomarcação para RANKL e TRAP, e menor para OPG, além de redução da FAO. ATV, ALD e ATV+ALD reduziram a MDI, sendo que as maiores doses impediram-na. Os tratamentos não alteraram a histomorfometria do LP ($p > 0,05$), causaram maior preservação óssea e radicular em relação a H_2O_d . ATV, ALD7 e ATV+ALD promoveram uma redução da quantificação de áreas hialinas ($p < 0,05$) em comparação a H_2O_d . ATV9 reduziu a MPO e os níveis de IL-1 β ($p < 0,05$) em relação a H_2O_d . ALD1 e ATV+ALD reduziram os níveis de IL-1 β ($p < 0,05$) quando comparado a H_2O_d . Todas as doses dos tratamentos reduziram a imunomarcação para RANKL e TRAP, e aumentou a marcação para OPG. Além disso, ATV, ALD e ATV+ALD reduziram a FAO em relação ao Normal. Entretanto ATV3 e 9, ALD1 e ATV+ALD aumentaram-na em relação ao grupo com MDI (H_2O_d), enquanto ALD7 protegeu essa redução de FAO. Em suma, ATV e ALD apresentaram efeitos anti-inflamatórios e antirreabsortivos ao reduzirem os níveis de MPO e/ou IL-1 β , a imunomarcação para RANKL e TRAP, além de interferirem no anabolismo ósseo aumentando a imunomarcação para OPG e níveis séricos de FAO.

Palavras-chave: Movimentação Dentária. Hipolipemiantes. Alendronato. Remodelação Óssea. Ratos.

ABSTRACT

ATORVASTATIN AND ALENDRONATE INFLUENCE THE INDUCED TOOTH MOVEMENT IN RATS REDUCING INFLAMMATORY AND RESORPTIVE ACTIVITIES, AND INCREASING BONE ANABOLISM

The induced tooth movement (MDI) depends on inflammatory and bone remodeling processes in sites of compression and traction. During orthodontic treatment, drugs can modulate the movement's rate. In this context, we investigated the influence of atorvastatin (ATV), alendronate (ALD), or combination of these drugs (ATV+ALD) on MDI in rats. First, groups of animals (n=6/group) were euthanized at the 6th hour, and on the 1st, 4st, 7st, 11st, 14st and 21st days, and they had their hemimaxillas analyzed for the distance between molars and incisors, histomorphometry of periodontal ligament (PL) of distobuccal, intermediate and distolingual roots, and myeloperoxidase activity (MPO; $\times 10^3$ U/mg of tissue). For pharmacological approach, the animals received by gavage during 28 d distilled water (H₂O_d, 2 ml/kg/d), ATV (1, 3 and 9 mg/kg/d), ALD (1 and 7 mg/kg/wk), or the combination of lower doses of these drugs (ATV+ALD). Then, the rats were submitted to MDI 11 days prior to euthanasia. The distance between molars and incisors, histomorphometry, MPO, IL-1 β levels (pg/mg of tissue), immunostaining for RANKL, OPG and TRAP, and serum levels of bone alkaline phosphatase (BALP; U/l) were evaluated. This study was approved by the Ethical aspects: Ethics Committee on Animal Research-UFC No. 21/14. The time course showed a reduction of the distance between molars and incisor, becoming significant from the 11th day, when compared to the 1st day. In the compression side, there was significant reduction in the PL and increased hyaline areas and traction areas in the 6th hour and on the 1st and 4th days. The LP returned to normal on the 7th day and the hyaline areas disappeared after the 14th day. MPO peaked between 6th hour and 1st days. Untreated animals showed decreased the distance between molars and incisors and had severe bone and root resorption, formation of hyaline areas in LP, an increase of MPO and IL-1 β levels, greater immunostaining RANKL and TRAP, and lower for OPG, and reducing BALP on the 11th days post MDI. ATV, ATV+ALD and ALD reduced MDI, and the highest doses prevented it. The treatments did not alter histomorphometry LP (p>0.05) and caused greater bone and root preservation. ATV, ATV+ALD and ALD7 reduced the hyaline areas (p<0.05) vs H₂O_d. ATV9 reduced MPO activity and IL-1 β levels (p<0.05) vs H₂O_d. ALD1 and ATV+ALD reduced the levels of IL-1 β (p<0.05) vs H₂O_d. All doses of the treatments reduced immunostaining for RANKL and TRAP, and increased the immunostaining for OPG. Furthermore, ATV, ALD and ATV+ALD reduced the BALP, when compared to non-treated animals. However, ATV3 and 9, ALD1 and ATV+ALD increased BALP vs H₂O_d, while ALD7 protected this reduction. In conclusion, ATV and ALD showed anti-inflammatory and antiresorptive effects by reducing MPO levels and/or IL-1 β , immunostaining for RANKL and TRAP, and interfere in the bone anabolism, by increasing OPG immunostaining and serum BALP.

Keywords: Tooth Movement. Hypolipidemic Agents. Alendronate. Bone Remodeling. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vias de indução da transcrição gênica de fatores que estimulam a formação óssea.	18
Figura 2	Processo inflamatório na MDI	20
Figura 3	Reabsorção óssea no lado de compressão	21
Figura 4	Formação óssea no lado de tração	22
Figura 5	Mecanismos de ação dos bisfosfonatos e das estatinas na via do mevalonato	32
Figura 6	Fotografia do modelo experimental de movimentação dentária induzida	38
Figura 7	Representação esquemática do curso temporal do modelo de movimentação dentária induzida até 21 dias	38
Figura 8	Esquema cronológico indicando os procedimentos específicos nos dias 0, 17 e 28	39
Figura 9	Representação esquemática do modelo de MDI por mola fechada Ni-Ti e abordagens farmacológicas	40
Figura 10	Fotomicrografia da área desafiada para análise histológica	42
Figura 11	Fotomicrografias com delineamento da quantificação das áreas de compressão e tração do ligamento periodontal, e áreas hialinas	44
Figura 12	Curva temporal da movimentação dentária nos dias 0, ¼, 1, 4, 7, 11, 14 e 21	49
Figura 13	Análise histomorfométrica no lado de compressão do ligamento periodontal nos dias 1, 4, 7, 11, 14 e 21	50
Figura 14	Análise histomorfométrica no lado de tração do ligamento periodontal nos dias 1, 4, 7, 11, 14 e 21	51
Figura 15	Análise histomorfométrica das áreas hialinas no lado de compressão do ligamento periodontal nos dias 1, 4, 7, 11, 14 e 21.	52

Figura 16	Fotomicrografias dos cortes transversais das raízes distovestibulares	54
Figura 17	Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido gengival de animais submetidos à movimentação dentária por 1, 4, 7, 11, 14 e 21 dias	55
Figura 18	Efeito da atorvastatina (ATV), do alendronato (ALD), e da combinação ATV + ALD na movimentação dentária induzida (MDI) em ratos.	57
Figura 19	Efeito da atorvastatina (ATV), do alendronato (ALD), e da combinação ATV + ALD na análise histomorfométrica.	59
Figura 20	Efeito da atorvastatina (ATV), do alendronato (ALD), e da combinação ATV + ALD na análise histomorfométrica das áreas hialinas.	60
Figura 21	Fotomicrografias dos cortes transversais das raízes distovestibulares.	61
Figura 22	Atividade de mieloperoxidase no tecido gengival de hemiarcadas normais e submetidas à movimentação dentária	63
Figura 23	Níveis de IL-1 β no tecido gengival de hemiarcadas normais e submetidas à movimentação dentária	64
Figura 24	Efeito da ATV sobre a marcação imunohistoquímica de RANKL após 11 dias de MDI.	66
Figura 25	Efeito de ALD sobre a marcação imunohistoquímica de RANKL após 11 dias de MDI	67
Figura 26	Efeito de ATV+ALD sobre a marcação imunohistoquímica de RANKL após 11 dias de MDI.	68
Figura 27	Efeito da ATV sobre a marcação imunohistoquímica de OPG após 11 dias de MDI.	69
Figura 28	Efeito de ALD sobre a marcação imunohistoquímica de OPG após 11 dias de MDI.	70
Figura 29	Efeito de ATV+ALD sobre a marcação imunohistoquímica de RANKL após 11 dias de MDI	71
Figura 30	Efeito da ATV sobre a marcação imunohistoquímica de TRAP após 11 dias de MDI.	72
Figura 31	Efeito de ALD sobre a marcação imunohistoquímica de TRAP após 11 dias de MDI.	73

Figura 32	Efeito de ATV+ALD sobre a marcação imunohistoquímica de RANKL após 11 dias de MDI.	74
Figura 33	Dosagens séricas de fosfatases alcalinas ósseas de animais submetidos à MDI.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALD	Alendronato
ATP	Adenosina trifosfato
ATV	Atorvastatina
Df	Dia final
Di	Dia inicial
DL	Distolingual (raiz)
DV	Distovestibular (raiz)
FAO	Fosfatase alcalina óssea
FAT	Fosfatase alcalina total
H ₂ O _d	Água destilada
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase
IGF	Fator de crescimento derivado da insulina/Insulin-like growth factor
IL	Interleucina
INT	Intermediária (raiz)
LP	Ligamento periodontal
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos/Mitogen activated protein kinases
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófago/Macrophage colony-stimulating factor
MDI	Movimentação dentária induzida
MMP	Metaloproteinase de matriz/Matrix metalloproteinases
MPO	Mieloperoxidase
NF-κB	Fator nuclear kappa-B
OPG	Osteoprotegerina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PTH	Hormônio da paratireoide/ Parathyroid hormone
RANK	Receptor ativador do fator nuclear NF-κB/Receptor Activator of Nuclear Factor κB
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear NF-κB/Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)
RUNX2	Fator transcricional relacionado a RUNT-2/ Runt-related transcription

	factor 2
TGF- β	Fator transformador de crescimento β /Transforming growth factor beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral/Tumor necrosis fator alpha
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato/Tartrate-resistant acid phosphatase
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular/Vascular endotelial growth fator

SUMÁRIO

1.	Introdução	16
1.1.	Remodelação óssea	16
1.2.	Movimentação dentária	19
1.3.	Abordagens farmacológicas	24
1.3.1.	Atorvastatina cálcica	24
1.3.2.	Alendronato de sódio	28
2.	Justificativa	34
3.	Objetivos	34
3.1.	Objetivo geral	34
3.2.	Objetivos específicos	34
4.	Metodologia	35
4.1.	Animais selecionados	35
4.2.	Aparelhos e instrumentos laboratoriais	35
4.3.	Fármacos, Reagentes, Soluções e outros materiais de consumo	36
4.4.	Protocolo experimental	36
4.4.1.	Curso temporal da movimentação dentária induzida (MDI)	37
4.4.2.	Grupos experimentais	39
4.4.3.	Analgesia pré-emptiva	41
4.5.	Análise macroscópica	41
4.6.	Análise histológica	42
4.7.	Análise da atividade de mieloperoxidase gengival	45
4.8.	Análise de IL-1 β por ELISA	45
4.9.	Análise imunohistoquímica para detecção de RANKL, OPG e TRAP	46

4.10.	Dosagem sérica de fosfatase alcalina óssea (FAO)	47
4.11.	Aspectos éticos	48
4.12.	Análise estatística	48
5.	Resultados	49
5.1.	Curva temporal da movimentação dentária induzida (MDI)	49
5.2.	Abordagens farmacológicas	56
5.2.1.	Análise macroscópica	56
5.2.2.	Análise histomorfométrica	58
5.2.3.	Análise histológica	61
5.2.4.	Atividade de mieloperoxidase	62
5.2.5.	Detecção de IL-1 β por ELISA	62
5.2.6.	Análise imunohistoquímica	65
5.2.7.	Dosagem sérica de fosfatase alcalina óssea	75
6.	Discussão	77
7.	Conclusão	90
	Referências	91
	Apêndice	110
	Controles negativos para a análise imunohistoquímica de RANKL, OPG e TRAP	110
	Anexo	111
	Aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal	111

1 INTRODUÇÃO

1.1 Remodelação óssea

O osso consiste em um tecido dinâmico que se encontra em adaptação contínua, sendo formado por células e uma matriz extracelular calcificada, a matriz óssea (DATTA *et al.*, 2008). Para a manutenção e reparação da estrutura óssea é necessário que haja uma sincronização de ambos os processos de reabsorção e aposição ósseas (RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

A remodelação óssea se inicia através de uma resposta dos osteócitos aos estímulos mecânicos ou hormonais, o que irá promover a liberação de fator de necrose tumoral (TNF) alfa, interleucina (IL)-6, hormônio da paratireoide (PTH) e o fator de crescimento derivado da insulina (IGF). Estes irão ativar osteoblastos em repouso, os quais são responsáveis por estimular a fusão de pré-osteoclastos e a diferenciação de osteoclastos maduros. Uma vez diferenciados, os osteoclastos polarizam e aderem à superfície óssea, o que culmina no início da reabsorção óssea propriamente dita pela acidificação da matriz óssea e liberação de enzimas lisossomais, como catepsina K e metaloproteinase de matriz 9. Conseqüentemente, há a degradação dos componentes orgânicos e inorgânicos da matriz, cujos restos são removidos por macrófagos (SIMS; MARTIN, 2014). Através da reabsorção da matriz óssea, há a liberação de fatores de crescimento, incluindo a proteína morfogenética óssea, fator de crescimento fibroblástico e fator de transformação de crescimento, os quais são responsáveis pelo recrutamento de osteoblastos. Estas células, por sua vez, irão produzir uma nova matriz mineralizada, concluindo o processo de remodelação (RUCCI, 2008; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010). Dessa forma, o desenvolvimento da arquitetura óssea se relaciona a componentes celulares coordenados entre si, compreendendo osteócitos, osteoclastos e osteoblastos. A atividade dessas células é regulada por forças mecânicas, renovação celular, hormônios, citocinas e fatores locais (DATTA *et al.*, 2008).

Os osteoclastos, derivados de células hematopoiéticas, atingem a maturação e se ativam a partir da sinalização do fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) e ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B (RANKL) (YAVROPOULOU; YOVOS, 2008). O RANKL, expresso principalmente por osteoblastos e também por células estromais (YASUDA *et al.*, 1998), fibroblastos

(QUINN *et al.*, 2000), células T ativadas (HORWOOD *et al.*, 1999), células B (MANABE *et al.*, 2001) e por osteócitos (O'BRIEN; NAKASHIMA; TAKAYANAGI, 2013), liga-se diretamente ao Receptor Ativador do Fator Nuclear- κ B (RANK) encontrado na superfície de osteoclastos e pré-osteoclastos. Desse modo, a ligação RANK–RANKL estimula a diferenciação dos pré-osteoclastos e a atividade de osteoclastos maduros. Por outro lado, a OPG, uma molécula solúvel, liga-se ao RANKL, bloqueando a interação de RANKL e seu receptor (RANK), prevenindo, assim, a osteoclastogênese, a reabsorção óssea e aumentando a apoptose de osteoclastos e, conseqüentemente, desempenhando a função de uma citocina antiosteoclastogênica (LACEY *et al.*, 1998).

O desenvolvimento dos osteoblastos ocorre através de células progenitoras mesodérmicas, as quais expressam o fator transcricional relacionado a RUNT-2 (RUNX2), regulado pelas vias das proteínas SMAD e MAPK (REDLICH; SMOLLEN, 2012). O fator transformador de crescimento β (TGF- β), a proteína morfogenética óssea (BMP) e a via Wnt/ β -catenina estimulam a expressão de RUNX2, promovendo a diferenciação osteoblástica e, conseqüentemente, a formação óssea (DATTA *et al.*, 2008).

A via Wnt/ β -catenina promove a proliferação e diferenciação de osteoblastos, prevenindo a apoptose dessas células (ALMEIDA *et al.*, 2005; BONEWALD; JOHNSON, 2008). A ativação ocorre pela ligação da proteína Wnt a cor-receptores, envolvendo lipoproteínas de baixa densidade (LRP5 ou LRP6) e um receptor Frizzled. O complexo de proteínas Wnt e receptores promovem a liberação de β -catenina não-fosforilada dentro do citoplasma, seguida da translocação para o núcleo, modulando a transcrição gênica (NEVE; CORRADO; CANTATORE, 2011). Além disso, esta via reduz a diferenciação osteoclástica pelo estímulo à produção e à secreção de OPG (GLASS *et al.*, 2005). A esclerostina, produzida por osteócitos, pode antagonizar a atividade de LRP5/6 (WESTENDORF; KAHLER; SCHROEDER, 2004) (Figura 1).

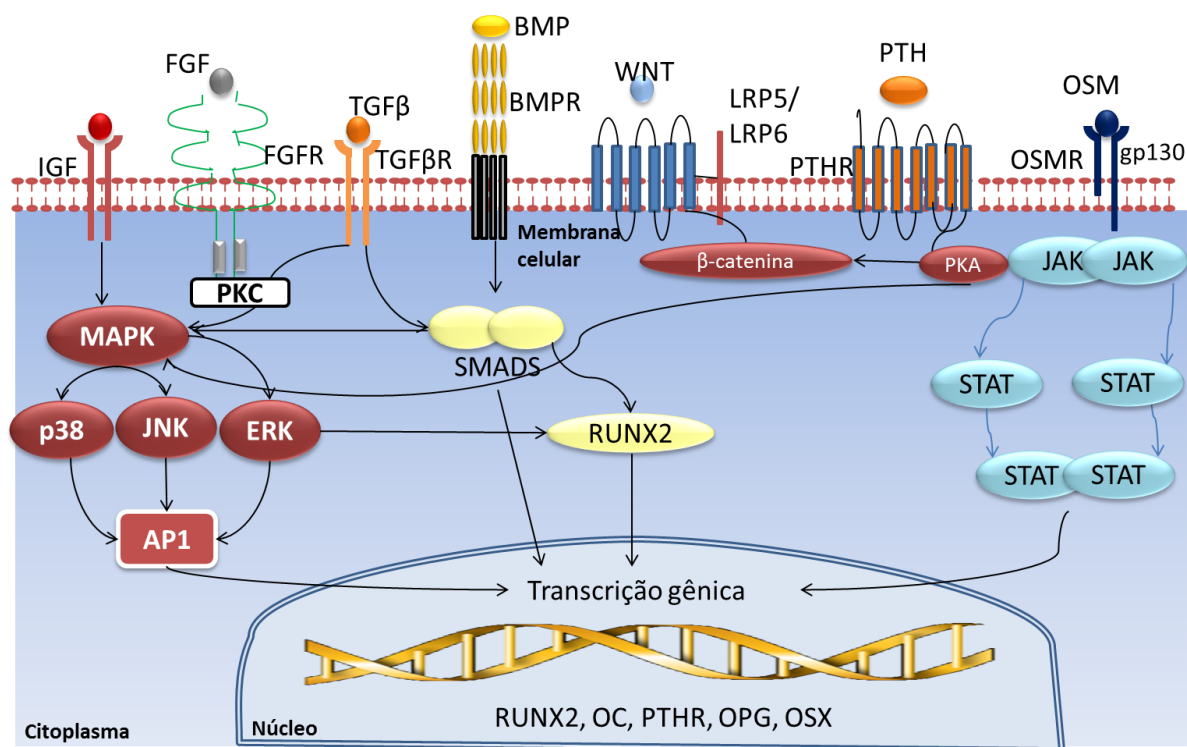


Figura 1. Vias de indução da transcrição gênica de fatores que estimulam a formação óssea. Fatores de crescimento, hormônios, via Wnt-β-catenina, e BMP podem promover a osteoblastogênese. Fonte: Redlich, Smolen, 2012 (Adaptado pelo autor).

Em um estado de homeostasia, há um equilíbrio na formação de células osteoblásticas e osteoclásticas. Entretanto, essa estabilidade pode ser influenciada por vários fatores que interferem na função dessas células ósseas, como hiperatividade de osteoclastos, distúrbios endócrinos e processos inflamatórios (REDLICH; SMOLLEN, 2012). A inflamação é caracterizada pela ativação de células do sistema imunológico inato e adaptativo que produzem citocinas inflamatórias, as quais, além de perpetuar a inflamação, também estimulam a reabsorção óssea e reduzem o processo de neoformação (MUNDY, 2007; ROMAS; GILLESPIE, 2006). De fato, a intensidade do processo inflamatório está correlacionada com as perdas ósseas local e sistêmica (REDLICH; SMOLLEN, 2012). Diferentes estudos têm abordado a relação entre as citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-11 e IL-17, e a atividade osteoclástica, destacando que estes mediadores podem interferir direta ou indiretamente pela modulação do sistema RANK/RANKL/OPG (ZUPAN; JERAS; MARC, 2013; MOON *et al.*, 2013).

As doenças ósseas, como a osteoporose e a artrite reumatoide, caracterizam-se principalmente por alterações tanto na estrutura, quanto no metabolismo dos minerais ósseos. Embora tais distúrbios sejam bastante

compreendidos, detalhes moleculares ainda carecem de maiores estudos (BULTINK *et al.*, 2012). Dessa forma, modelos de reabsorção óssea alveolar em animais, como a reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura e a movimentação dentária induzida, dentre outros, têm sido utilizados, a fim de favorecer uma melhor compreensão dos processos de remodelação óssea.

1.2 Movimentação dentária

A ortodontia, dentre as especialidades odontológicas, destaca-se pelo uso de princípios biomecânicos que baseiam a execução de movimentos dentários visando à restauração da função e estética oral do paciente (WATTED *et al.*, 2014). Para que ocorra a movimentação dentária é necessário o envolvimento simultâneo do ligamento periodontal e do osso alveolar, onde as células e a matriz extracelular do ligamento periodontal irão produzir e liberar substâncias que participarão da remodelação óssea alveolar. A aplicação de uma dada força promoverá uma redução na vascularização, recrutamento de leucócitos para os tecidos periodontais, favorecendo o aparecimento de zonas de compressão e tração do ligamento periodontal decorrentes do movimento do dente no alvéolo, e consequentes proliferação e diferenciação de células do ligamento periodontal e de precursores de células ósseas. (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006).

Inicialmente, no lado de compressão, ocorre uma mudança no fluxo sanguíneo, seguido pelo aparecimento de zonas de hialinização caracterizadas por uma trombose capilar, morte celular e a produção de áreas livres de células e eosinofílicas, semelhantes à cartilagem hialina em cortes histológicos (MEIKLE, 2006). A reabsorção deste tecido necrótico por macrófagos e a reabsorção óssea por osteoclastos promove a movimentação dentária propriamente dita. No lado de tração, há a ativação do fluxo sanguíneo, promovendo o aumento da atividade osteoblástica e a consequente formação óssea (VON BÖHL *et al.*, 2009).

Estes eventos promovem a produção e a liberação de vários mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, os quais favorecem a manutenção das alterações vasculares e celulares e estimulam o remodelação óssea (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006).

Sabe-se que a expressão de citocinas está diretamente relacionada à movimentação ortodôntica e à diferenciação e à ativação de osteoclastos, uma vez

que podem ser encontradas em altas concentrações no ligamento periodontal submetido às forças ortodônticas. Estudos mostram que mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , -6 e -17, TNF- α , M-CSF e prostaglandina E₂ (PGE₂) podem estimular a atividade osteoclástica (BRAUN; ZWERINA, 2011; SCHETT, 2011), sendo detectados em níveis mais elevados no lado de compressão do ligamento periodontal (REN *et al.*, 2007; HAYASHI *et al.*, 2012; MITSUI *et al.*, 2005; KAKU *et al.*, 2008) (Figura 2).

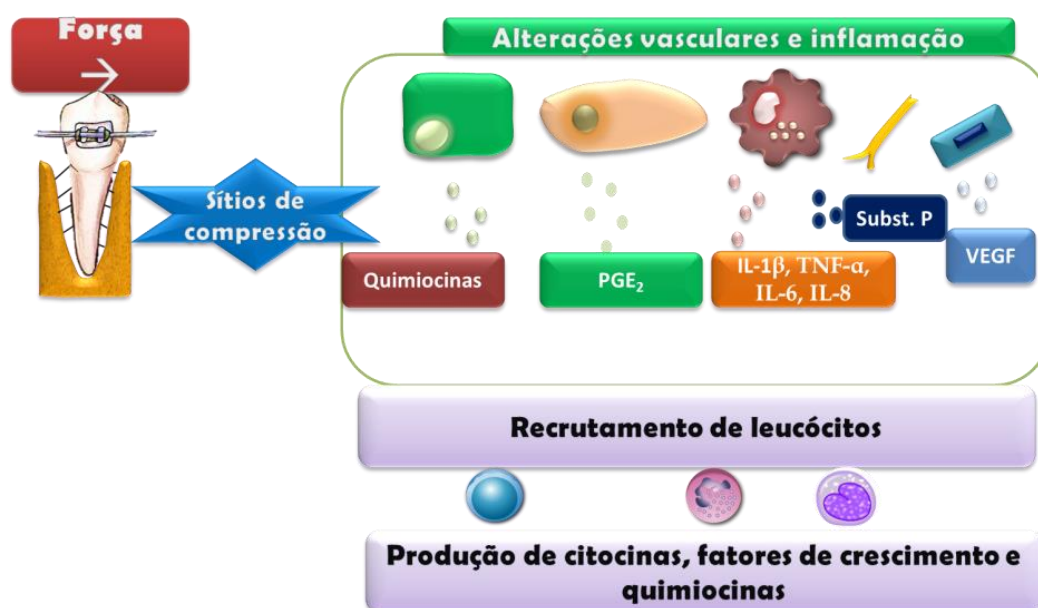


Figura 2. Processo inflamatório na movimentação dentária induzida (MDI). Nos sítios de compressão do ligamento periodontal ocorre um processo inflamatório, caracterizado pela presença de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e fatores de crescimento. Estes irão estimular o recrutamento de mais leucócitos, os quais irão perpetuar o processo inflamatório, interferindo, posteriormente, na remodelação óssea. Fonte: Elaborada pelo autor.

Na movimentação dentária, o eixo RANK-RANKL influencia a osteoclastogênese, visto que ocorre um aumento da regulação da expressão de RANKL em ligamentos periodontais submetidos ao estresse mecânico, além de uma redução dos níveis de OPG nos sítios de compressão (TYROVOLA *et al.*, 2008; GARLET *et al.*, 2007) (Figura 3). Adicionalmente, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) também pode induzir indiretamente a reabsorção óssea, ao estimular a sinalização de osteoclastos para a matriz extracelular, desempenhando um papel no desenvolvimento ósseo (YANG *et al.*, 2008).

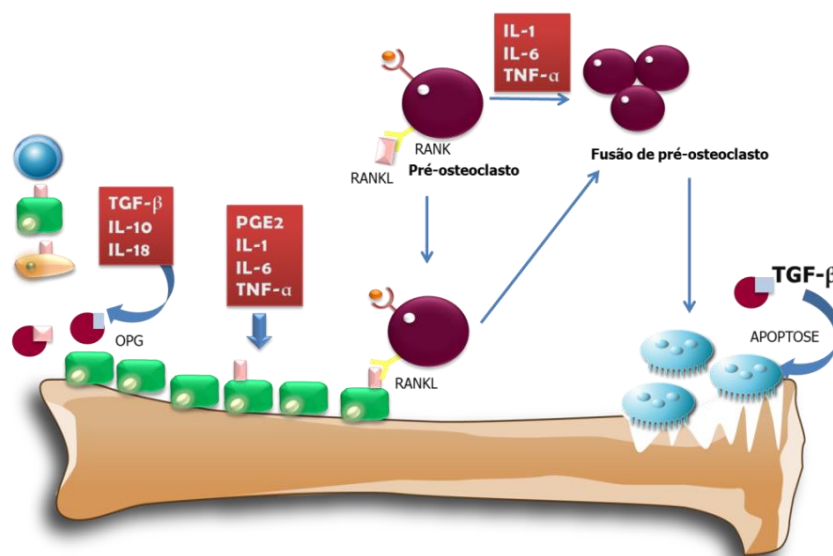


Figura 3. Reabsorção óssea no lado de compressão. No lado de compressão do ligamento periodontal, a regulação da reabsorção óssea ocorre via eixo RANK/RANKL/OPG. Além disso, citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α , também podem estimular indiretamente a reabsorção óssea. Fonte: Elaborada pelo autor.

Quanto à presença das quimiocinas, níveis de CCL-2, CCL-3, CCL-5 e CXCL8 (IL-8) mostram-se elevados após 24 horas de aplicação de força na distalização de caninos (ALIKHANI *et al.*, 2013), sugerindo que estas quimiocinas também estão relacionadas ao processo de movimentação dentária. Quando se comparou os níveis de IL-8 nos sítios de tração e compressão, observou-se uma maior concentração desta quimiocina no lado de tração, considerando um período de 1 a 6 dias de aplicação de força (TUNCER *et al.*, 2005).

Os sítios de tração também são caracterizados pela presença de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e OPG, uma vez que estão envolvidas na inibição da reabsorção óssea, além de fatores de crescimento, como TGF- β , relacionado com a proliferação e diferenciação de osteoblastos (GARLET *et al.*, 2007) (Figura 4).

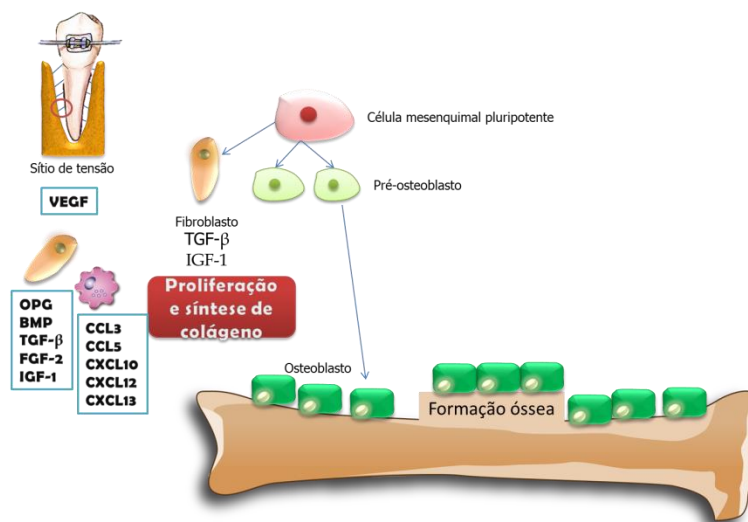


Figura 4. Formação óssea no lado de tração. Nos sítios de tração, ocorre a formação óssea e a proliferação e síntese de colágeno. Neste processo, participam quimiocinas, fatores de crescimento, proteína morfogenética óssea e osteoprotegerina. Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com a progressão da remodelação óssea, pode-se sugerir que as taxas de movimentação dentária estão diretamente relacionadas com o tempo, distinguindo-se três fases. A fase inicial é caracterizada por um movimento rápido após a aplicação da força, sendo a movimentação atribuída ao deslocamento do dente no espaço periodontal. A segunda fase envolve um atraso (latência), uma vez que ocorrem baixas taxas de deslocamento dentário devido à hialinização nas áreas de compressão do ligamento periodontal. A terceira fase, denominada de fase de pós-latência, a taxa de movimentação dentária aumenta gradualmente devido aos processos de aposição e reabsorção óssea (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006).

Em relação à magnitude da força, esta varia de acordo com os movimentos desejados. Contudo, forças de maior intensidade não implicam diretamente em maiores taxas de movimentação dentária, uma vez que forças excessivas podem promover um atraso na movimentação dentária devido à formação de muitos focos de hialinização no ligamento periodontal e reabsorção radicular (GONZALES *et al.*, 2008; NAKANO *et al.*, 2011; NAKANO *et al.*, 2014). O decréscimo de renovação óssea em adultos pode interferir no sucesso do tratamento ortodôntico. Algumas doenças que influenciam o metabolismo de deposição e reabsorção ósseas, como a osteoporose, podem modificar o resultado do tratamento ortodôntico (LOTWALA *et al.*, 2012).

Tem sido demonstrado que para o controle da progressão das doenças ósseas existem diversas classes de fármacos que objetivam limitar a reabsorção

óssea ou estimular a neoformação óssea. No entanto, sabe-se que algumas abordagens farmacológicas, como os bisfosfonatos, podem interferir nas taxas de movimentação dentária, porém, tendo como principal efeito adverso a osteonecrose dos maxilares (RINCHUSE *et al.*, 2007; KRIEGER *et al.*, 2013; ZAHROWSKI *et al.*, 2009). Visto que esses fármacos possuem uma meia-vida longa, necessita-se de uma anamnese minuciosa antes da realização do tratamento ortodôntico, considerando o metabolismo ósseo alterado e a extensão dos efeitos colaterais (TARVADE; KAOKAR, 2014; KRIEGER *et al.*, 2013).

A reabsorção radicular apical consiste em outra complicação do tratamento ortodôntico que pode resultar em perda permanente da estrutura dentária e pode estar diretamente associada à duração do tratamento, à magnitude da força aplicada, à direção da movimentação e ao método de aplicação de força (TOPKARA; KARAMAN; HAU, 2012; WELTMAN *et al.*, 2010). Outro fator que também pode influenciar no sucesso do tratamento ortodôntico consiste na situação periodontal. Em pacientes com periodonto reduzido, a superfície do ligamento periodontal responsável pelo amortecimento das forças também é diminuída, assim, as condições biológicas e biomecânicas diferem daquelas de pacientes com periodonto mais adequado (GKANTIDIS; CHRISTOU; TOPOUZELIS, 2010).

Considerando as inúmeras questões que limitam os tratamentos ortodônticos, são necessários estudos para a melhor compreensão dos processos de remodelação óssea e de reabsorção radicular. Nesse contexto, a movimentação dentária induzida em animais tem sido objeto de investigação. Dentre as espécies utilizadas, destacam-se os modelos em ratos (KARRAS *et al.*, 2009; HAN *et al.*, 2010; KAIPATUR *et al.*, 2013). Apesar de possuírem algumas, mesmo que poucas, diferenças anatômicas e estruturais no tecido ósseo em relação aos humanos, considera-se que os roedores sejam bons modelos para estudos de movimentação dentária, atentando-se para os aspectos de custo, amostra em estudo, período de manutenção, análises microscópicas e técnicas de biologia molecular e celulares (DI DOMENICO *et al.*, 2012; REN; MALTHA; KUJIPERS-JAGTMAN, 2004).

A respeito dos procedimentos utilizados para indução da movimentação dentária, a literatura demonstra que a metodologia de execução do modelo pode compreender a colocação de elásticos nos incisivos ou entre molares (KIM *et al.*, 2013), a ancoragem com mini-implantes (KAWAZOE *et al.*, 2013; KAIPATUR *et al.*, 2013), o uso de dispositivos desenvolvidos pelos próprios pesquisadores com molas

helicoidais (BABA *et al.*, 2011), e ativação com molas fechadas de níquel titânio (HELLER; NANDA, 1979; WANG *et al.*, 2014). Essas últimas destacam-se por sua facilidade de manuseio e pela capacidade de distribuição de força de maneira contínua e controlada (REN; MALTHA; KUJIPERS-JAGTMAN, 2004). Quanto à escolha do período para a realização da movimentação dentária induzida, não há um consenso na literatura. Ao estudar um período de observação de 3, 5, 7 e 9 dias, Fracalossi *et al.* (2009) descreveram que a movimentação dentária em ratos deveria estar melhor relacionada ao período entre 5 e 9 dias da força aplicada. Li *et al.* (2013) detectaram que a partir do 9º dia até o 12º dia ocorriam maiores lacunas de reabsorção óssea com um número significativo de osteoclastos, bem como uma maior taxa de movimentação dentária.

Dessa forma, a movimentação dentária decorre de uma série de eventos biológicos capazes de alterar os mediadores inflamatórios relacionados à remodelação óssea. Nesse contexto, fármacos que interferem nos processos inflamatório e reabsortivo ósseo podem influenciar de alguma maneira o curso do tratamento ortodôntico, por interferirem nos diversos processos metabólicos ósseos.

1.3 Abordagens farmacológicas

1.3.1 Atorvastatina cálcica

A atorvastatina, membro da classe farmacológica das estatinas, consiste em um inibidor da 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase (HMG-CoA), a qual desempenha a função de catalisar a etapa limitante da síntese do colesterol, convertendo HMG-CoA em mevalonato (ENDO *et al.*, 1977; ISTVAN, 2003). As estatinas possuem seu uso associado ao tratamento da hipercolesterolemia (MARON; FAZIO; LINTON, 2000) e de doenças cardiovasculares (REINER, 2013), além de reduzirem os riscos de eventos coronarianos e cerebrovasculares (BRUGTS *et al.*, 2009). Ainda, sabe-se que as estatinas podem interferir na redução de risco de desenvolvimento de câncer (SINGH; SINGH, 2013).

As estatinas se ligam à HMG-CoA redutase em concentrações nanomolares, promovendo o deslocamento do substrato natural, HMG-CoA (ISTVAN; DEISENHOFER, 2001). A inibição da biossíntese do colesterol é acompanhada por um aumento na expressão do receptor da lipoproteína lipase

hepática, o que promove a captação e remoção do colesterol na corrente sanguínea (VEILLARD; MACH, 2002).

Diversos estudos têm elucidado os mecanismos anabólicos ósseos promovidos pelas estatinas. Sabe-se que, por inibirem a HMG-CoA redutase, esses fármacos bloqueiam a síntese do mevalonato e, conseqüentemente, seus produtos (farnesil pirofosfato e pirofosfato de geranilo) (TONG; HOLSTEIN; HOHL, 2005), os quais são relacionados à prenilação de proteínas GTPases, como Rho e à maturação e integridade do citoesqueleto do osteoclasto. Dessa forma, as estatinas podem interferir na diferenciação de osteoclastos, reduzindo a reabsorção óssea, como também, na estimulação da formação óssea, visto que aumenta as expressões de proteína morfogenética óssea tipo 2, osteocalcina, fosfatase alcalina, colágeno tipo 1, fator de crescimento endotelial vascular e a diferenciação de osteoblastos (WEIVODA; HOHL, 2011; MAEDA *et al.*, 2004).

Existem dois subtipos de estatinas comercialmente disponíveis. As naturais são derivadas de fermentação e incluem a sinvastatina e pravastatina, sendo a primeira a mais potente. As demais, as estatinas sintéticas, as quais incluem a atorvastatina, rosuvastatina e fluvastatina, devido à alteração na molécula mevastatina, possuem uma maior potência em relação às estatinas naturais (HORIUCHI; MAEDA, 2006).

As estatinas em geral possuem uma taxa de absorção entre 30% e 98% da dose e atingem uma concentração máxima no plasma em até 4 horas após sua administração. A absorção diária pode variar de acordo com o horário de tomada e a de ingestão de alimentos (PAN *et al.*, 1990; TSE; JAFFE; TROENDLE, 1992; CILLA *et al.*, 1996; MÜCK *et al.*, 1997; GARNETT, 1995). Em relação à ingestão de alimentos, esta pode reduzir significativamente a biodisponibilidade da atorvastatina (RADULOVIC *et al.*, 1995). Entretanto, quanto aos efeitos hipolipemiantes, estes fármacos possuem eficácias semelhantes, independente do horário da administração (PAN *et al.*, 1990; TSE; JAFFE; TROENDLE, 1992; CILLA *et al.*, 1996; MÜCK *et al.*, 1997; GARNETT, 1995). Quanto à metabolização, esta ocorre predominantemente no fígado pelas enzimas do citocromo P450. A inibição da HMG-CoA redutase depende parcialmente dos metabólitos ativos. Para a atorvastatina, os principais metabólitos são os ácidos 2-hidroxi e 4-hidroxi atorvastatina (BOTTORF; HANSTEN, 2000; JACOBSEN *et al.*, 2000). A via predominante para a eliminação da maioria das estatinas é através da bile após o

metabolismo hepático. Conseqüentemente, a disfunção hepática consiste em um fator de risco para miopatia induzida por estatinas, devendo-se restringir a prescrição de estatinas para pacientes com hepatopatias (MARON; FAZIO; LINTON, 2000).

Além desses efeitos clínicos, as estatinas também são reconhecidas por seus efeitos pleiotrópicos, incluindo o anabolismo ósseo e ações vasodilatadoras, antitrombóticas, antioxidantes, anti-inflamatórias e imunossupressoras (ZHANG *et al.*, 2014; MUNDY *et al.*, 2001). Sabe-se que as estatinas podem influenciar o metabolismo ósseo pela inibição da apoptose de osteoblastos e supressão da osteoclastogênese. A literatura demonstra que esses fármacos podem estimular a formação óssea pela sinalização da via TGF- β /SMAD3, visto que esta via está relacionada à supressão da atividade apoptótica osteoblástica (KAJI *et al.*, 2008). A formação óssea promovida pelas estatinas também pode ser explicada pelo estímulo ao VEGF (WONG; RABIE, 2004), uma vez que este pode induzir a proliferação e diferenciação de osteoblastos, através da atividade das células endoteliais em produzir fatores osteoanabólicos (DECKERS *et al.*, 2000). Ainda, sabe-se que as estatinas podem modular a atividade de osteoclastos através da sinalização da via RANK/RANKL/OPG pela regulação de receptores de estrógeno (SONG *et al.*, 2008). Kim *et al.* (2012) demonstraram um mecanismo adicional associado à inibição da osteoclastogênese pela atorvastatina. Segundo esses autores, este fármaco pode inibir o RANKL nos sinoviócitos de pacientes com artrite reumatoide de maneira dose-dependente, prevenindo a destruição óssea.

A respeito dos efeitos benéficos particularmente da atorvastatina na densidade mineral óssea, não há um consenso na literatura. Apesar de Bone *et al.* (2007) não ter encontrado uma mudança significativa na densidade mineral óssea e nos níveis de marcadores bioquímicos de pacientes sob uso de atorvastatina, Pérez-Castrillon *et al.* (2008) mostraram que esse fármaco foi capaz de aumentar os níveis de vitamina D em 33% e causou um estímulo na densidade mineral em pacientes com doenças cardiovasculares.

Estudos também têm observado resultados positivos das estatinas na progressão da periodontite. Esta é considerada uma doença inflamatória crônica em resposta à infecção polimicrobiana. Caracteriza-se pela destruição tecidual como consequência da alteração no equilíbrio entre a microbiota dos tecidos periorais e a resposta do hospedeiro em indivíduos susceptíveis (PAGE; KORNMAN, 1997;

SANZ; WINKELHOFF, 2011). Nesse contexto, Fajardo *et al.* (2010) observaram que a atorvastatina proporcionou melhoras nos parâmetros periodontais, mobilidade dentária e profundidade radiográfica nos defeitos intraósseos. Quanto à atividade anti-inflamatória das estatinas, estudos evidenciam que a associação do uso desses fármacos e o tratamento periodontal podem reduzir significativamente a concentração de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no fluido crevicular gengival (FENTOGLU *et al.*, 2012; SURESH *et al.*, 2013). Ao analisar radiograficamente a perda óssea alveolar induzida por ligadura, Goes *et al.* (2010) observaram que 9 mg/kg de atorvastatina durante 11 dias foram capazes de reduzir cerca de 43% a perda óssea, mostrando o seu efeito antirreabsortivo. Posteriormente, Balli *et al.* (2014), em um modelo de periodontite semelhante destacaram que a administração de atorvastatina promoveu um decréscimo na perda óssea alveolar e na perda do nível de inserção clínica, além de aumentar a imunorreatividade de VEGF e diminuir a atividade de metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9).

Quanto à osseointegração de implantes, Du *et al.* (2009, 2011) enfatizaram que a sinvastatina melhorou a osseointegração de implantes de titânio, como também aumentou os níveis sorológicos de marcadores da formação óssea, principalmente a fosfatase alcalina óssea.

Quanto aos efeitos adversos, as estatinas são comumente bem toleradas. A maioria desses efeitos é leve, como desconforto gastrointestinal. A atorvastatina possui boa relação custo-benefício (COSTA-SCHARPLATZ *et al.*, 2008), quando comparada a outras estatinas (NEWMAN *et al.*, 2008), tornando-se uma abordagem terapêutica importante na prática clínica. O principal problema associado à terapia com estatinas consiste na hepatotoxicidade caracterizada por um aumento de transaminases hepáticas, lesões hepatocelulares e coleestáticas, reações do tipo autoimune e insuficiência hepática fulminante (LIU *et al.*, 2010). De fato, Ellesat *et al.* (2010) revelaram que a atorvastatina e a sinvastatina promoveram efeito citotóxico dose-dependente em hepatócitos, entretanto, a atorvastatina apresentou-se menos tóxica. Além disso, pode ocorrer mialgia em aproximadamente 10% dos pacientes, podendo progredir para rabdomiólise, geralmente caracterizada por necrose massiva muscular, mioglobinúria e insuficiência renal aguda (WILLIAMS; FEELY, 2002). Os efeitos adversos são geralmente devido a altas dosagens de estatinas ou interações medicamentosas excessivas que inibem o metabolismo da estatina. Ao avaliar a segurança das estatinas na dislipidemia em pacientes diabéticos, Bener *et al.* (2014)

evidenciaram que os fármacos avaliados apresentaram segurança nas funções musculares e hepáticas e a administração de atorvastatina resultou em menor número de pacientes com microalbuminúria.

1.3.2 Alendronato de sódio

O alendronato de sódio pertence à classe dos bisfosfonatos, análogos sintéticos dos compostos de pirofosfato, e apresenta a capacidade de inibir potencialmente a reabsorção óssea, podendo ter seu uso relacionado às doenças que interferem no metabolismo ósseo, como osteoporose (IMAI, 2013), Doença de Paget (SILVERMAN, 2008) e metástases ósseas (RUSSEL *et al.*, 2008). Essa atividade pode ser explicada pela alta afinidade dessa classe farmacológica à hidroxiapatita, desempenhando ações sobre os osteoclastos e no osso neoformado (DOMINGUEZ *et al.*, 2011).

Estudos têm procurado elucidar os mecanismos moleculares da ação dos bisfosfonatos, tornando possível a divisão dessa classe farmacológica em dois subgrupos estruturais. O primeiro grupo abrange os bisfosfonatos não-nitrogenados (etidronato, clodronato, tiludronato), cujos metabólitos promovem o bloqueio da função dos osteoclastos pela inibição de enzimas dependentes de ATP (LEHENKARI *et al.*, 2002). Por outro lado, os bisfosfonatos nitrogenados (alendronato, risedronato, zoledronato) bloqueiam a via do mevalonato, interferindo na enzima farnesil pirofosfato sintetase (FPP) (BALLANTYNE, 2015). Conseqüentemente, haverá um decréscimo nos seus produtos (farnesil pirofosfato e pirofosfato de geranilo) (BERGSTRON *et al.*, 2000), os quais são necessários para a modificação pós-translacional (prenilação) de proteínas como as GTPases (ROGERS, 2004). Estas desempenham um papel significativo na sinalização de proteínas que regulam uma variedade de processos celulares para função de osteoclastos, incluindo a organização do citoesqueleto (ZHANG *et al.*, 1995; KE *et al.*, 2013). Assim, esses fármacos possuem habilidade de promover a apoptose dos osteoclastos, enquanto em osteócitos e osteoblastos, os bisfosfonatos podem exercer efeitos positivos, uma vez que protegem essas células da apoptose induzida por glicocorticoides *in vitro* e promovem a diferenciação osteoblástica (PLOTKIN; MALOLAGAS; BELLIDO, 2006; JEONG *et al.*, 2013).

Os bisfosfonatos podem ser administrados pelas vias intravenosa e oral, o que pode interferir na sua biodisponibilidade. Os bisfosfonatos nitrogenados, amplamente utilizados, têm uma absorção de aproximadamente 0,7% e os não-nitrogenados possuem uma absorção ligeiramente superior a 2-2,5%. Além disso, a absorção oral pode ser reduzida na presença de alimentos, cálcio, magnésio, alumínio e pH gástrico elevado (CREMERS; PILLAI; PAPAPOULOS, 2005; DUNN; GOA, 2001; GERTZ *et al.*, 1995). Quanto à distribuição desses fármacos no organismo, sabe-se que um a dois terços dos bisfosfonatos tornam-se incorporados no esqueleto e o restante é excretado na urina após a administração. A utilização desses fármacos resultam em uma redução substancial dos marcadores de remodelação óssea, como telopeptídeo N-terminal do colágeno tipo 1 e fosfatase alcalina sérica, atingindo um efeito máximo em 3 a 6 meses, e se mantendo em um estado estacionário de no mínimo 10 anos com a continuação do tratamento (BONE *et al.*, 2004).

Os bisfosfonatos se acumulam ao tecido ósseo por um longo período de tempo, favorecendo à formação de um reservatório o qual continua a ser liberado por meses ou anos após o tratamento ser interrompido (PAPAPOULOS; CREMERS, 2007). A quantidade de alendronato liberada após um tratamento de 10 anos é equivalente a um quarto da dose usual (RODAN *et al.*, 2004). Dentre os representantes desta classe farmacológica, o ácido zoledrônico e o alendronato destacam-se pela maior afinidade óssea e pela ação farmacológica residual mesmo após a descontinuação do fármaco (RUSSEL *et al.*, 2008).

Dentre as indicações para o uso de bisfosfonatos, destaca-se a osteoporose, caracterizada por uma perda e deterioração da arquitetura óssea, colaborando para um aumento no risco de fraturas (BROWN *et al.*, 2014). Nesse contexto, os bisfosfonatos podem promover benefícios, reduzindo os sinais da progressão da doença. A respeito dos marcadores da remodelação óssea, como fosfatase alcalina e telopeptídeo N-terminal do colágeno de tipo 1, comprovou-se que o alendronato possui propriedades em reduzir os níveis bioquímicos desses marcadores (MUKAIYAMA *et al.*, 2015), aumentando a densidade mineral e diminuindo o risco de fraturas em mulheres na pós-menopausa e em homens com osteoporose ou osteopenia (BONE *et al.*, 2004; ENSRUD *et al.*, 2004; IWAMOTO; UZAWA, 2014). Ainda, demonstrou-se que o alendronato também pode promover benefícios na preservação do osso trabecular (DI GREGORIO *et al.*, 2015). De fato,

estudos mostram efeitos potentes dos bisfosfonatos na reabsorção óssea, uma vez que estes foram associados ao decréscimo dos níveis de RANKL e ao aumento da expressão de OPG em osteoblastos humanos (PAN *et al.*, 2004; VIERECK *et al.*, 2002).

Considerando que a periodontite consiste em uma doença imunoinflamatória caracterizada pela destruição óssea, muitos estudos têm avaliado os benefícios do alendronato de sódio nessa condição. Goes *et al.* (2012) mostraram que o alendronato foi capaz de prevenir a redução da fosfatase alcalina e a perda óssea alveolar e promover redução do infiltrado inflamatório gengival, confirmando as vantagens da utilização desse fármaco na periodontite experimental. Em estudo clínico, o gel de alendronato em uma concentração de 1% diminuiu, de forma significativa, a profundidade de sondagem e aumentou o nível de inserção clínica em pacientes com periodontite agressiva (SHARMA; PRADEEP, 2012).

Apesar desses benefícios no tecido ósseo, a administração clínica de alendronato pode provocar alguns efeitos adversos, incluindo a osteonecrose dos maxilares, fraturas atípicas subtrocantéricas e associadas à diáfise do fêmur e câncer de esôfago (BROWN *et al.*, 2014; OROZCO; MAALOUF, 2012).

Define-se a osteonecrose dos maxilares como uma área óssea exposta na região maxilofacial, não-cicatrizável em 8 semanas e presentes em pacientes que estão recebendo bisfosfonato não submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço (RASMUSSEN; ABTAHI, 2014). Há evidências que existe uma relação entre a dose e o tipo de bisfosfonato administrado e o desenvolvimento da osteonecrose, visto que a incidência em pacientes sob tratamento com altas doses de bisfosfonatos utilizados na indicação oncológica é estimada entre 1 e 10%, enquanto em pacientes recebendo doses farmacológicas menores para o tratamento da osteoporose, a incidência é cerca de 1:10000, relacionando-se à duração do tratamento (RUGGIERO *et al.*, 2009; KHAN *et al.*, 2009; COMPSTON, 2011). Alguns fatores podem aumentar o risco para osteonecrose, como extração dentária ou outros procedimentos cirúrgicos na cavidade oral, quimioterapia, doença periodontal, supuração local, terapia com glicocorticoides, diabetes e imunossupressão (KHAN *et al.*, 2015).

Apesar de existirem evidências de que os bisfosfonatos podem reduzir o processo de movimentação dentária, ainda não há estudos que confirmem que o tratamento ortodôntico pode aumentar o risco a osteonecrose. Quanto à patogênese

da doença, vários mecanismos têm sido relacionados ao desenvolvimento deste quadro, incluindo a supressão da renovação óssea maxilar, infecção e inflamação, inibição da angiogênese e efeitos imunomodulatórios. Assim, a etiologia da doença não se apresenta completamente elucidada (COMPSTON, 2011). Entretanto, sugere-se que esta condição inicia-se com uma osteomielite, cuja manutenção é realizada por bactérias presentes na cavidade oral, como *Actinomyces* e *Staphylococcus* (RASMUSSEN; ABTAHI, 2014). Além disso, têm-se associado o desenvolvimento da osteonecrose a doenças e procedimentos na cavidade oral, tais como, doença periodontal, exodontias, implantes dentários, traumas provocados por dentaduras (COMPSTON, 2011).

A respeito do risco de fraturas atípicas femurais, paradoxalmente, diversos estudos têm mostrado uma associação entre os bisfosfonatos e a ocorrência desses eventos adversos. De fato, Odvina *et al.* (2010) demonstraram que a terapia com alendronato e risedronato aumentaram o risco de fraturas e sugeriram que este resultado pode estar relacionado à supressão da renovação óssea, com consequente acúmulo de microdanos e desenvolvimento de osso hipermineralizado. Giusti *et al.* (2011) evidenciaram que a maioria das fraturas atípicas ocorreram com o uso prolongado de alendronato, e relacionaram este fato à biodisponibilidade e uso generalizado do fármaco. Entretanto, é necessário destacar que os benefícios dos bisfosfonatos em prevenir as fraturas associadas à osteoporose ultrapassam os riscos de fraturas femurais atípicas (BROWN *et al.*, 2014).

Quanto ao risco de câncer de esôfago, não há explicações consistentes do seu risco aumentado com o uso de bisfosfonatos, uma vez que estudos têm demonstrado resultados controversos em relação à ocorrência desse tipo de câncer e a administração desses fármacos pela via oral (CARDWELL *et al.*, 2010; GREEN *et al.*, 2010; ABRAHAMSEN *et al.*, 2012).

Considerando que o surgimento de efeitos colaterais são importantes, especialmente dos bisfosfonatos, os quais podem ser encontrados incorporados à matriz óssea mesmo após anos de cessado seu uso (WATTS; DIAB, 2010), abordagens que visem propiciar interações medicamentosas vantajosas podem ser úteis. Nesse sentido, estudos utilizando combinações diversas tais como sinvastatina, alendronato e ciclodextrina beta resultaram em menor perda óssea na periodontite induzida por LPS (PRICE *et al.*, 2013). De fato, outros autores

demonstraram que subdosagem de alendronato combinada à dosagem de atorvastatina foram capazes de prevenir a perda óssea e a resposta inflamatória no modelo de periodontite induzida por ligadura em ratos (GOES *et al.*, 2014).

Os mecanismos de ação de ambos os fármacos está representados na figura 5.

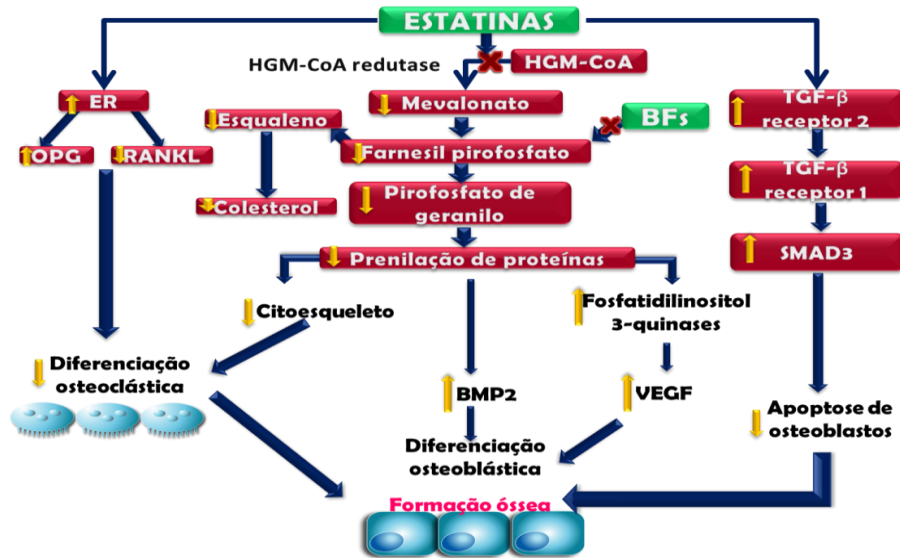


Figura 5. Mecanismos de ação dos bisfosfonatos e das estatinas na via do mevalonato. As estatinas podem exercer seus efeitos antirreabsortivos ao interferir na via do mevalonato pela inibição da HGM-CoA redutase e ao estimular receptores de estrogênio (ER) que regulam o eixo RANK/RANKL e OPG. Ainda, sabe-se que as atorvastatinas podem exercer efeitos anabólicos ao reduzir a apoptose de osteoclastos via TGF- β /SMAD3 e pelo aumento da produção de VEGF e BMP2. Por sua vez, os bisfosfonatos (BFs) possuem seus efeitos antirreabsortivos também relacionados à inibição da via do mevalonato pelo bloqueio da enzima farnesil pirofosfato sintetase, interferindo na organização estrutural do citoesqueleto de osteoclastos. Fonte: Ruan, Zheng, Wang, 2012 (Adaptado pelo autor).

2 JUSTIFICATIVA

Os avanços científicos e tecnológicos, associados à modernização de técnicas e procedimentos em saúde têm resultado à sociedade um aumento de acessibilidade a diversos serviços de maior qualidade e efetividade, especialmente em saúde bucal. Estes aspectos, somados a um maior nível de conhecimento da população em geral acerca de suas necessidades em termos de saúde e estética, têm contribuído ao número crescente de pacientes adultos que buscam tratamento ortodôntico. Contudo, as diferenças anatômicas e fisiológicas, a situação periodontal ou restauradora, a ausência de potencial de crescimento, grau de reabsorção radicular, presença de disfunções temporomandibulares, bem como a história médica e uso de várias medicações, dentre outros, podem interferir na evolução da remodelação óssea e devem ser consideradas no planejamento do tratamento desses pacientes, fazendo-se necessários estudos contínuos tanto com o objetivo de conhecer mecanismos intrínsecos do metabolismo ósseo alveolar, bem como os mecanismos relativos às ações de fármacos potencialmente capazes de interferir nesses processos.

Nesse contexto, o uso de modelo animal de movimentação dentária induzida por força aplicada a uma estrutura dental confere uma maneira simples de mimetizar os principais eventos de remodelação óssea vista em humanos, como reabsorção e neoformação ósseas. Ainda, fármacos utilizados para tratamento de condições médicas diversas podem influenciar o processo do movimento dentário, reduzindo ou aumentando a velocidade da movimentação e exercendo efeitos nas células envolvidas na remodelação do tecido ósseo e do ligamento periodontal. Então, pareceu razoável avaliar a atividade da atorvastatina e do alendronato, e sua combinação, com o intuito de melhor compreender seus efeitos antirreabsortivos ósseos no curso da movimentação dentária induzida.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi verificar os efeitos anti-inflamatórios e antirreabsortivo da atorvastatina, do alendronato e de sua combinação na movimentação dentária induzida..

3.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da ATV e do ALD através de:

- Mensuração da movimentação dentária através de medidas macroscópicas diretas;
- Microscopia do osso alveolar e ligamento periodontal (histometria e imunohistoquímica para RANKL, OPG e TRAP);
- Dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO) gengival;
- Dosagens dos níveis gengivais de IL-1 β por ELISA;
- Dosagem sérica de fosfatase alcalina óssea.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais selecionados

Foram utilizados 98 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com massa corpórea entre 180 e 220 gramas e com aproximadamente três meses de idade. Esses animais foram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC), transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina (FAMED) Fortaleza-CE, e mantidos em gaiolas apropriadas, com o máximo de 6 animais em cada uma delas. Estes receberam ração comercial balanceada apropriada e água à vontade, e permaneceram nas mesmas condições ambientais durante os experimentos. Todos os esforços foram realizados no sentido de diminuir o número de animais e seu sofrimento, com base nas orientações para pesquisas com animais e o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará-CE, Brasil (número de protocolo 21/14).

4.2 Aparelhos e instrumentos laboratoriais

- Abridor de boca de rato (conformado pelo Laboratório de Farmacologia Oral-UFC, Fortaleza-CE, Brasil);
- Agitador magnético 725^a (Fisatom, São Paulo-SP, Brasil);
- Agitador Vortex (Phoenix, Araraquara-SP, Brasil);
- Alcoômetro Gay-Lussac (Incoterm, Porto Alegre-RS, Brasil);
- Algodão e gaze (CREMER[®], Blumenau-SC, Brasil);
- Alicata ortodôntico de corte de amarelo (Quinelato[®] - ref. QO.151.00; Rio Claro-SP, Brasil);
- Balança digital BS3000 (Bioprecisa BS3000, Curitiba-PR, Brasil);
- Balança digital modelo MF6/1 (Filizola, São Paulo-SP, Brasil);
- Balança eletrônica de precisão (Sartorius BL 210S, Gotinga – Baixa Saxônia, Alemanha);
- Balança eletrônica de precisão FA2104N (Bioprecisa, Curitiba-PR, Brasil);
- Banho-maria digital NT 245 (Nova Técnica Equipamentos, Piracicaba-SP, Brasil);
- Centrífuga 80-2B (Centribio, São Paulo-SP, Brasil);
- Centrífuga Eppendorf – 5804R (Eppendorf, Hamburgo-HA, Alemanha)

- Destilador modelo 016 (Fabbe Primar, São Paulo-SP, Brasil);
- Espátula 7 (Golgran, São Caetano do Sul-SP, Brasil);
- Espectrofotômetro Uv-5100B (SENOVA, Xangai, China);
- Fio de amarrilho de aço inox de 0,008 polegadas (Morelli[®] - ref. 55.01.208; Sorocaba-SP, Brasil);
- Fotopolimerizador Led (Ecco[®] - Campinas-SP, Brasil);
- Freezer a -80 °C (Revco Elite Plus – Thermoscientific, San Jose, EUA);
- Homogeneizador de amostras – Polytron PT10-35 (Kinematica, Lucerna, Suíça);
- Leitor de placas tipo ELISA modelo ELX 800 (BioTek Instruments, Winooski-Vermont, EUA);
- Máquina de gelo EGE 300M (Everest, Rio de Janeiro-RJ, Brasil);
- Microscópio óptico (Nikon Eclipse Ci, Tóquio-Honshu, Japão);
- Microscópio modelo 175045 (Zeiss, Oberkochen-Baden-Württemberg, Alemanha);
- Mola fechada de níquel-titânio (Morelli[®]-ref. 35.20.064; Sorocaba-SP, Brasil);
- Motor cirúrgico (Driller[®], Carapicuíba-SP, Brasil);
- Pinça clínica (Golgran, São Caetano do Sul-SP, Brasil);
- Pipetas automáticas (LABMATE+, Varsóvia, Polônia);
- Porta-agulha Mathieu (Golgran, São Caetano do Sul-SP, Brasil);
- Refrigerador biplex 350 (Cônsul, São Paulo-SP, Brasil);
- Tensiômetro (Morelli[®] - ref.75.02.009, Sorocaba-SP, Brasil);
- Tesoura cirúrgica (Golgran, São Caetano do Sul-SP, Brasil).

4.3 Fármacos, Reagentes, Soluções e outros materiais de consumo

- Água destilada;
- Álcool etílico absoluto (Dinâmica, Diadema-SP, Brasil);
- Alendronato de sódio (Fosamax[®], Merck Sharp Dohme - MSD, Kenilworth-Nova Jérsei, EUA);
- Atorvastatina (Lipitor[®], Pfizer, São Paulo-SP, Brasil);
- Corante rápido de hematoxicilina e eosina (NewProv[®], Pinhais-PR, Brasil);

- EDTA P.A. (Dinâmica, Diadema-SP, Brasil);
- Formaldeído 37,5% (Dinâmica, Diadema-SP, Brasil);
- Ketamina (Cetamin® – Syntec®, Hortolândia-SP, Brasil);
- Resina Composta (LLiS – FGM®, Joinville-SC, Brasil);
- Soro fisiológico 0,9% (NaCl 0,15 M) Frasco com 500 ml (ADV, Nova Odessa-SP, Brasil);
- Xilasina (Xilazin® – Syntec®, Hortolândia-SP, Brasil).

4.4 Protocolo Experimental

4.4.1 Curso temporal da Movimentação dentária induzida (MDI)

Nesse estudo, foi utilizado um modelo de movimentação dentária induzida (MDI) por dispositivo ortodôntico descrito anteriormente por Heller e Nanda, em 1979, e adaptado em nosso laboratório por Dutra, 2010. Heller e Nanda utilizavam uma mola fechada, cuja ativação correspondia a 50 gf, fixada entre o primeiro molar superior direito e o incisivo direito. Em nosso modelo, realizou-se a MDI através de molas fechadas de níquel-titânio (Morelli®-ref. 35.20.064; Sorocaba-SP, Brasil) fixadas entre o primeiro molar superior esquerdo e os incisivos superiores por meio de fio de amarrilho de aço inox de 0,008 polegadas (Morelli® - ref. 55.01.210; Sorocaba-SP, Brasil). Para melhor adaptação e sustentação da mola, criou-se um pequeno sulco na região cervical dos incisivos centrais com o auxílio de um disco de corte em um contra-ângulo odontológico sob irrigação com soro fisiológico e realizou-se uma retenção adicional por meio de resina fotopolimerizável (LLiS - FGM®, Joinville-SC, Brasil). A seguir, foi feita a ativação da mola de 1 a 2 milímetros, correspondendo a 50 gf mensurada por tensiômetro (Morelli® - ref.75.02.009, Sorocaba-SP, Brasil) (KARRAS *et al.*, 2009; KAIPATUR *et al.*, 2013). Nenhuma ativação adicional foi feita durante os dias subsequentes, havendo apenas monitoramento diário quanto à presença ou não do dispositivo (Figura 6).

Inicialmente, foi avaliado o curso temporal da MDI por mola fechada. Para tanto, grupos de 6 animais cada, sob anestesia por combinação de cloridrato de quetamina (100 mg/kg-im) e cloridrato de xilazina (20 mg/kg-im), foram eutanasiados após 6 horas, 1, 4, 7, 11, 14 e 21 dias de MDI, quando então as hemiarçadas foram analisadas macroscopicamente e removidas para processamento histológico.

Adicionalmente, foram removidas amostras de tecido gengival subjacente à área do primeiro molar superior esquerdo para análise da atividade da enzima mieloperoxidase (Figura 7) ou Elisa para citocinas. Em função dos dados obtidos, escolheu-se o 11º dia, uma vez que a partir deste dia houve uma maior taxa de movimentação dentária induzida, para as devidas abordagens farmacológicas.



Figura 6. Fotografia do modelo experimental de movimentação dentária induzida. Posicionamento da mola fechada com fixação no primeiro molar superior esquerdo e nos incisivos superiores. Detalhe de resina na face vestibular dos incisivos para promover maior retenção mecânica (Fonte: Laboratório de Farmacologia Oral).

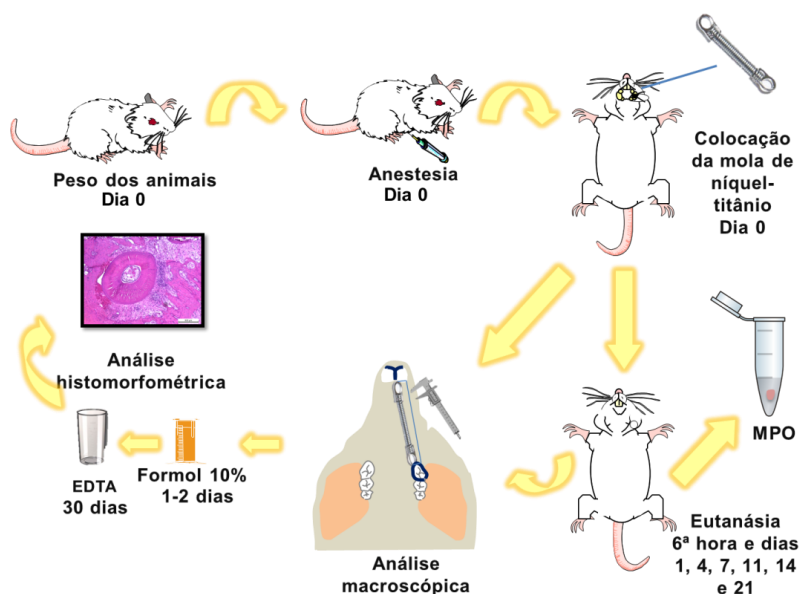


Figura 7. Representação esquemática do curso temporal do modelo de movimentação dentária induzida até 21 dias. Os animais, previamente anestesiados, foram submetidos à instalação da mola de níquel-titânio, e nos dias 1, 4, 7, 11, 14 e 21, ocorreu a eutanásia. As hemiarcadas foram removidas para análises macroscópica e histológica. Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.2 Grupos experimentais

Como explicitado anteriormente, escolheu-se o 11º dia, visto que a partir deste ponto temporal da curva a MDI foi significativamente estabelecida em relação ao 1º dia. Então, seguiram-se as abordagens farmacológicas com a atorvastatina e o alendronato, como monoterapia, ou por combinação das menores doses entre si. O intuito de se utilizar as menores doses foi o de se observar o efeito sinérgico entre ambas. Dessa forma, seguiram-se os seguintes grupos controles ou de tratamentos. Durante 28 dias, realizou-se a administração de fármacos, e 11 dias antes do término do período experimental, o dispositivo ortodôntico foi instalado (Figura 8).

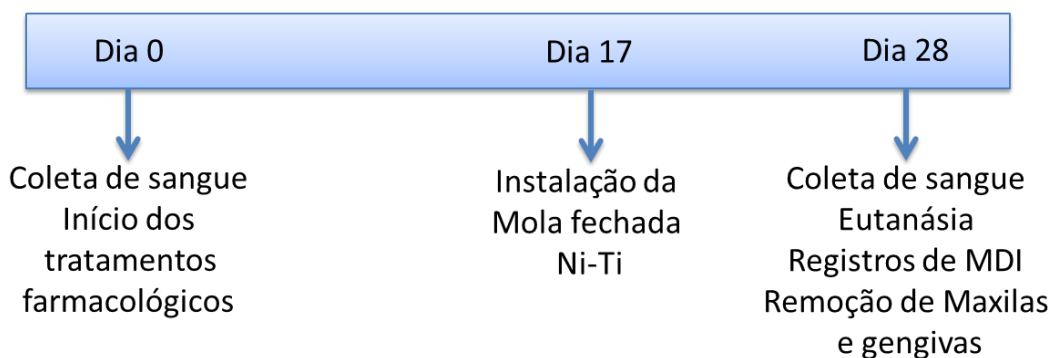


Figura 8. Esquema cronológico indicando os procedimentos específicos nos dias 0, 17 e 28. Nos demais dias, os animais foram pesados e tratados conforme os grupos experimentais Atorvastatina (ATV), Alendronato (ALD) ou ATV+ALD. Fonte: Elaborado pelo autor.

- Grupos Controle

Esses grupos foram constituídos por 8 animais cada, os quais receberam por gavagem apenas o veículo, água destilada (2 ml/kg), diariamente, durante 28 dias até a eutanásia, sendo que 17º dia os animais foram submetidos a MDI por mola fechada de Ni-Ti, perfazendo um total de 11 dias de MDI.

-Grupos Atorvastatina (ATV)

Esses grupos foram constituídos por 8 animais cada, os quais receberam por gavagem ATV (Lipitor[®], Pfizer, São Paulo-SP, Brasil) nas doses de 1, 3, 9 mg/kg, diariamente, durante 28 dias até a eutanásia, sendo que 17º dia os animais foram submetidos a MDI por mola fechada de Ni-Ti, perfazendo um total de 11 dias de MDI. Essas doses foram escolhidas a partir dos estudos de Goes *et al.* (2010) e Farag, Mohamed, Youssef, 2013.

-Grupos Alendronato de sódio (ALD)

Esses grupos foram constituídos por 8 animais cada, os quais receberam por gavagem ALD (Fosamax[®], Merck Sharp Dohme, Kenilworth-Nova Jérsei, EUA) nas doses de 1 e 7 mg/kg, semanalmente, durante 28 dias até a eutanásia, sendo que no 17^o dia os animais foram submetidos a MDI por mola fechada de Ni-Ti, perfazendo um total de 11 dias de MDI. Essas doses foram baseadas nos estudos de Karras *et al.* (2009) e Aguirre *et al.* (2010).

- Grupos combinação com atorvastatina e alendronato de sódio

Esses grupos foram constituídos por 8 animais cada, os quais receberam por gavagem ATV na dose de 1 mg/kg e ALD na dose de 1 mg/kg, diariamente e semanalmente, respectivamente, durante 28 dias. No 17^o dia, os animais foram submetidos a MDI por mola fechada de Ni-Ti, perfazendo um total de 11 dias de MDI.

A figura 9 demonstra, resumidamente, as atividades desenvolvidas e o protocolo experimental.

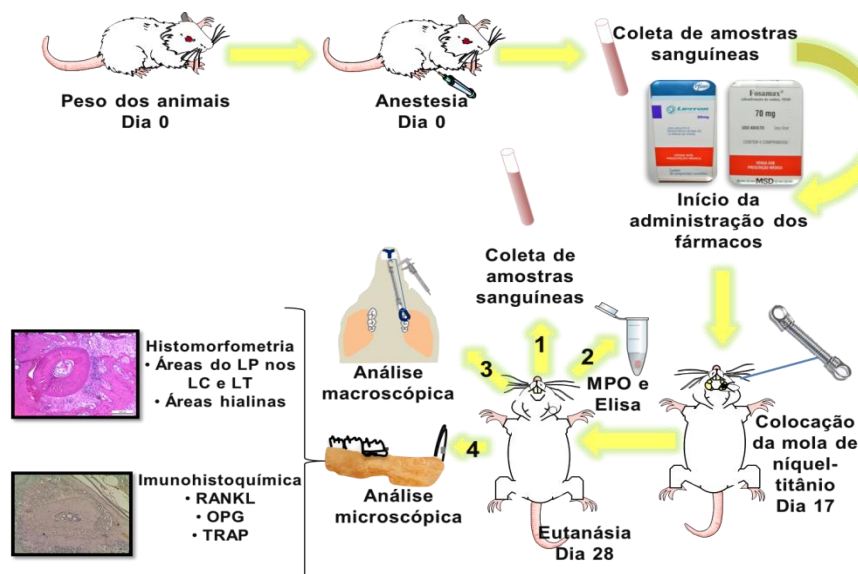


Figura 9. Representação esquemática do modelo de MDI por mola fechada Ni-Ti e abordagens farmacológicas. Os ratos receberam, por gavagem, água destilada (H₂O_d, 2 ml/kg), Atorvastatina (ATV 1, 3 e 9 mg/kg), alendronato (1 e 7 mg/kg) e combinação (ATV 1 mg/kg + ALD 1 mg/kg) durante 28 dias. No 17^o dia, foi realizada a instalação do dispositivo ortodôntico entre o 1^o molar superior esquerdo e os incisivos superiores durante 11 dias, quando, então, foram eutanasiados e os seguintes parâmetros avaliados: (1) Fosfatase alcalina óssea pela coleta de amostras sanguíneas; (2) Análise do tecido gengival através da atividade de mieloperoxidase (MPO) e de IL-1 β por Elisa; (3) Análise macroscópica pela distância entre incisivos e molares; (4) Análises microscópicas através de histomorfometria e imunohistoquímica para RANKL, OPG e TRAP. LC: lado de compressão. LP: ligamento periodontal. LT: lado de tração. Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.3 Analgesia pré-emptiva

No modelo de movimentação dentária induzida, há a participação de diversos mediadores inflamatórios que interferem no metabolismo ósseo. Desta forma, a administração de um analgésico pode interferir nesse processo. Conforme o art.11º, §§5º e 6º da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008:

Art. 11. Compete ao Ministério da Ciência e Tecnologia licenciar as atividades destinadas à criação de animais, ao ensino e à pesquisa científica de que trata esta Lei

[...]

§ 5º Experimentos que possam causar dor ou angústia desenvolver-se-ão sob sedação, analgesia ou anestesia adequadas;

§ 6º Experimentos cujo objetivo seja o estudo dos processos relacionados à dor e à angústia exigem autorização específica da CEUA, em obediência a normas estabelecidas pelo CONCEA.

Considerando que a dor também é um processo inflamatório, justificamos a não utilização de fármacos analgésicos antes do procedimento de colocação da mola. Adicionalmente, tal justificativa se baseia por estudos prévios publicados na literatura (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2015).

4.5 Análise macroscópica

Imediatamente após a eutanásia dos animais, foram feitas mensurações da MDI, considerando os espaços entre os incisivos e os primeiros molares superiores, tanto na hemiarcada desafiada, como também em sua contralateral. Tais medidas foram registradas no dia da colocação da mola, ou seja, dia de início do processo (D_i) e na eutanásia, dia final (D_f), com o auxílio de um paquímetro digital. Assim, a quantidade de deslocamento dos molares no sentido mesial, foi calculada segundo a fórmula:

$$MDI = \frac{[(D_i - D_f)_{\text{hemiarcada MDI}} - (D_i - D_f)_{\text{hemiarcada contralateral}}]}{D_{i_{\text{hemiarcada contralateral}}}} \times 100\%$$

4.6 Análise histológica

Após a realização das análises macroscópicas, as hemiarcadas foram removidas e fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas. A seguir, foram desmineralizadas em EDTA a 10%, durante, aproximadamente, 30 dias. Posteriormente, as hemiarcadas foram lavadas em água corrente por 24 horas e, após a inclusão em parafina, foram feitos os cortes seriados de 4 μm em micrótomo apropriado. As lâminas obtidas foram coradas pelo método de hematoxilina e eosina.

Na análise microscópica das hemiarcadas, foram considerados os cortes transversais das raízes intermediária (INT), distovestibular (DV) e distolingual (DL) dos primeiros molares superiores (Figura 10).

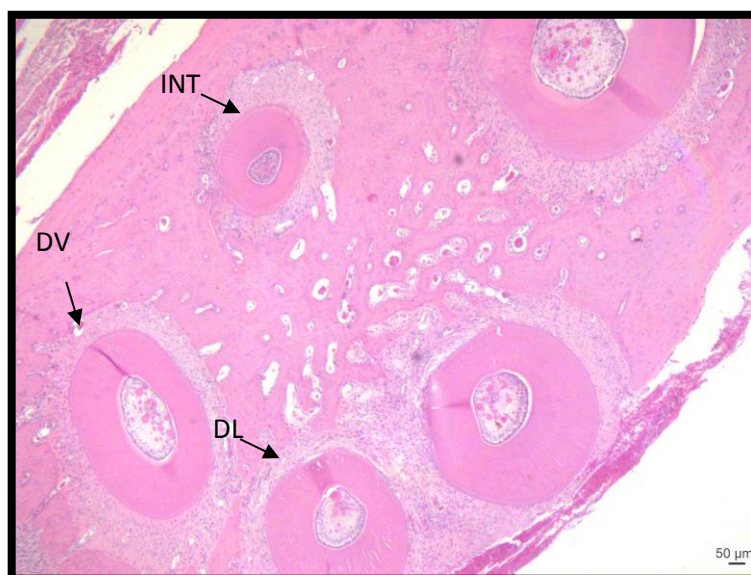


Figura 10. Fotomicrografia da área desafiada para análise histológica. Corte transversal da maxila do rato no terço cervical do primeiro molar esquerdo. No destaque estão as raízes utilizadas para a análise histomorfométrica.

As imagens das lâminas obtidas foram digitalizadas por um sistema de análise, através de microscópio óptico (Nikon Eclipse Ci, Tóquio-Honshu, Japão). Nas fotomicrografias, identificaram-se as estruturas do ligamento periodontal, osso alveolar, cimento, dentina e polpa (Figura 11A). Após a aquisição das imagens, foram quantificadas (%) as áreas de compressão e de tração do ligamento periodontal, e hialinas no *software* NIS Elements Documentation[®]. Para tanto, foram realizadas duas medidas, a primeira delimitada pelo trabeculado ósseo (Figura 11B),

e a segunda pelo cemento radicular (Figura 11C). A área total do ligamento periodontal foi obtida, então, pela diferença entre a primeira e a segunda medidas. Posteriormente, foram calculadas as áreas do ligamento periodontal nos lados de compressão e tração delimitadas por um ângulo de 120° (Figuras 11D e 11E).

Desse modo, as áreas de compressão e tração foram calculadas a partir da razão entre as áreas compreendidas por esse ângulo no lado de compressão e tração, e área total do ligamento periodontal. Em seguida, foram contornadas áreas hialinas do ligamento periodontal, e obtida a razão entre esta e área total do ligamento periodontal, de forma a definir o percentual de áreas hialinas no ligamento periodontal de cada raiz (Figura 11F).

Devido à grande variabilidade do material biológico e à irregularidade da estrutura óssea alveolar, foram padronizados os lados de compressão e de tração do ligamento periodontal como a área compreendida, nas suas respectivas regiões, dentro dos limites de um ângulo de 120° . Este ângulo, por sua vez, foi o escolhido por abranger uma área considerável ($2/3$ na mesial e $2/3$ na distal da raiz) em cada lado do ligamento periodontal, e impedir, com maior segurança, que áreas de transição entre compressão e tração do ligamento periodontal fossem consideradas nas análises histomorfométricas.

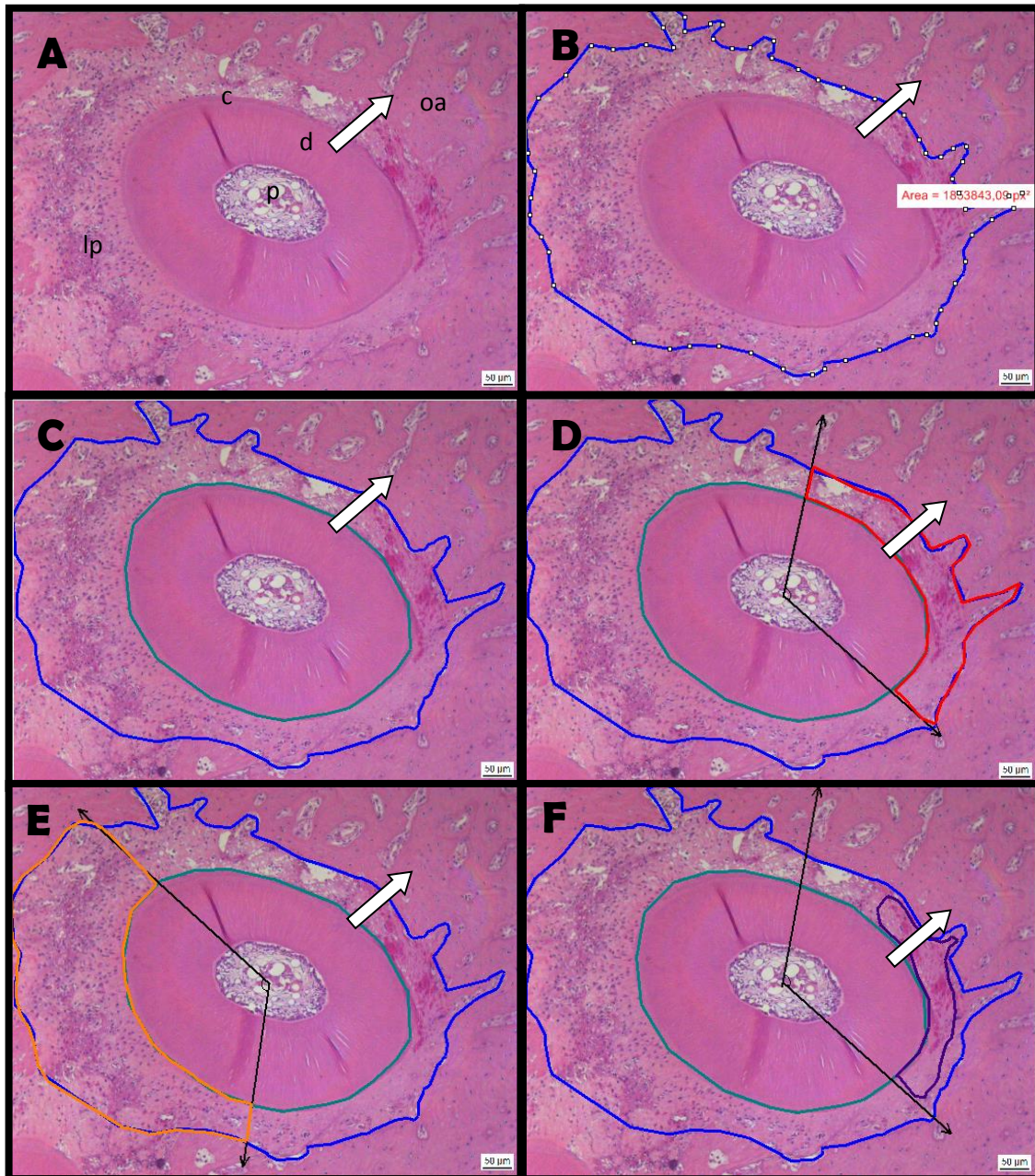


Figura 11. Fotomicrografias com delineamento da quantificação das áreas de compressão e tração do ligamento periodontal, e áreas hialinas. A. Fotomicrografia demonstrando as estruturas do periodonto das raízes (oa: osso alveolar; d: dentina; c: cimento; p: polpa; lp: ligamento periodontal); B. Traçado em azul da área delimitada pelo trabeculado ósseo; C. Traçado em verde da área delimitada pelo cimento; D. Delimitação em vermelho da área do ligamento periodontal no lado de compressão dentro do ângulo de 120°; E. Delimitação em laranja da área do ligamento periodontal no lado de tração dentro do ângulo de 120°; F. Delimitação em roxo das áreas hialinas no ligamento periodontal. A seta branca demonstra a direção da força aplicada.

4.7 Análise da atividade de mieloperoxidase gengival

Esta análise foi realizada para quantificar a atividade da enzima mieloperoxidase, a qual consiste em uma enzima abundante nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos ativos em processos inflamatórios em vários tecidos. O protocolo foi realizado conforme metodologia descrita por Lima *et al.* (2005), adaptada de Bradley, Christensen, Rothstein, 1982.

Para tanto, no 28^o dia, o tecido gengival dos 8 animais de cada grupo utilizados para análise macroscópica da MDI, bem como a amostra da hemiarcada contralateral foram removidos, mantidos a -80 °C em freezer e posteriormente homogeneizados e processados para posterior análise em Leitor Automático de Placas. Assim, o tecido gengival foi pesado e triturado em solução contendo NaCl (100 mM), EDTA (15 mM) e NaPO₄ (20 mM) e o homogenato foi centrifugado a 4 °C por 15 minutos (3000 g). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C para o ensaio de ELISA. O pellet foi, então, submetido a solução hipotônica 900 µl de NaCl a 0,2%; 900 µl de NaCl a 1,6%; 900 µl de glicose 5% e novamente centrifugado a 4 °C por 15 min (3000 g). O pellet final foi ressuspendido em solução contendo NaPO₄ a 50 mM e hexadecil-trimetil-brometode amônio (H-TAB), e homogeneizado a 4 °C por 15 min (10000 g). O sobrenadante foi usado para o ensaio de MPO usando tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM), e a concentração de MPO foi determinada em absorbância de 490 nm.

Os valores foram expressos em atividade de MPO por miligrama de gengiva comparada à curva padrão construída utilizando neutrófilos peritoneais de ratos. Para alcançar este objetivo, a migração de neutrófilos foi induzida por injeção intraperitoneal de carragenina em ratos (300 µg por animal). Uma curva padrão de neutrófilos (> 90% de pureza) e os números de absorbância foram obtidos por processamento de neutrófilos purificados, como descrito acima, e o ensaio da atividade de MPO foi realizado.

4.8 Análise de IL-1β por ELISA

Esta análise foi realizada para quantificar os níveis de IL-1β. O sobrenadante resultante do ensaio da atividade de mieloperoxidase foi utilizado para detecção dos níveis de IL-1β.

Para a realização do referido ensaio, o tecido gengival coletado foi homogeneizado em tampão PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2 – 7,4). Inicialmente, placas de 96 poços foram incubadas por 12 h a 4 °C com anticorpo anti-IL-1 β . Após sensibilização das placas, as amostras foram adicionadas em duplicata e a curva padrão serão adicionadas em várias diluições e incubadas por 2 h a 4 °C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão PBS/Tween-20 (0,05% SIGMA) e incubadas com anticorpo monoclonal biotilado anti-IL-1 β (1:1000 com BSA/Tween 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1 h, as placas foram lavadas e 50 μ L do complexo HRP-estreptavidina diluído 1:5000 foram adicionados. Decorridos 15 minutos, o reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 50 μ L) foi adicionado e as placas foram incubadas na ausência de luz a 37 °C por 15 a 20 min. A reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄ (1M) e a densidade óptica foi medida a 490 nm em espectrofotômetro para anti-IL-1 β . As concentrações das citocinas contidas nas amostras foram calculadas a partir de uma curva padrão com 11 pontos, obtida por diluição seriada, sendo as concentrações iniciais de 4000 pg/mL. O resultado foi expresso em picograma de citocinas (CUNHA *et al.*, 1993).

4.9 Análise imunohistoquímica para detecção de RANKL, OPG e TRAP

Para esta análise, os mesmos blocos utilizados na análise histológica foram cortados em cortes seriados (4 μ m) em lâminas com poli L-lisina (Probe on Plus[®]) adequadas para a técnica de imunohistoquímica. Inicialmente, os cortes seriados foram desparafinizados em estufa a 60 °C e hidratados à temperatura ambiente por meio de imersões consecutivas em xilol, álcool 95% e água destilada, em determinados períodos de tempo para cada solução, para, em seguida, serem imersos em solução tamponada 0,1M (tampão de citrato, pH 6,0) sob aquecimento a 65°, por 30 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas incubação em peróxido de hidrogênio a 3 %, para bloqueio da peroxidase endógena, intercaladas por lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS). A fim de se obter o bloqueio das ligações proteicas inespecíficas, foi realizado o bloqueio de proteína com BSA 5%.

Posteriormente, a incubação com um dos anticorpos primários anti-RANKL (1:200), anti-OPG (1:100) ou anti-TRAP (1:100) foi feita durante a noite (*overnight*), por 18 horas, a 4 °C. Após esse tempo, realizou-se a lavagem seguida da incubação com anticorpo (secundário) biotilado anti-IgG, por 30 minutos, à temperatura de 22 °C a 25 °C. Durante esse período, o complexo ABC foi preparado para incubação posterior, conforme instruções do fabricante.

Após nova lavagem com PBS, foi realizada a revelação da reação através de uma coloração utilizando o cromógeno 3,3 diaminobenzidina DAB/peróxido, por 2 a 3 minutos, à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas foram contracoradas por hematoxilina de Meyer por 7 minutos, à temperatura ambiente.

Os controles negativos foram processados simultaneamente como descritos acima, sendo que o primeiro anticorpo foi substituído por PBS-BSA 5%. Nenhum dos controles negativos mostrou imunorreatividade para RANKL, OPG e TRAP (Apêndice A). Por fim, foi realizada a desidratação em uma série de concentrações de álcoois, e clareamento em xilol das amostras e finalmente, as respectivas montagens das lâminas e lamínulas.

4.10 Dosagem sérica de Fosfatase Alcalina Óssea (FAO)

Antes da instalação da mola (dia zero), e na eutanásia (dia 28), foram coletadas amostras sanguíneas para avaliação através de dosagem indireta da isoforma óssea da Fosfatase Alcalina Total (FAT), a FAO. A quantificação foi realizada seguindo a metodologia da inativação térmica das amostras (MOSS; WHITBY, 1975) (Labtest[®], Lagoa Santa-MG, Brasil).

Previamente, foram identificados os tubos de ensaio em Branco, Padrão e Amostra. Adicionou-se então a quantidade de 250 µl do tampão e 25 µl de substrato. Em seguida, adicionou-se 25 µl da amostra nos tubos assim identificados e 25 µl de padrão no tudo assim identificado inicialmente. Todos os tubos foram aquecidos a 37 °C em banho-maria por 10 minutos. Em seguida, foi adicionada 1 ml do reagente de cor, a fim de que fossem processadas as leituras espectrofotométricas em 590 nm. Então, determinou-se a fosfatase alcalina óssea pela diferença da dosagem da fosfatase alcalina total (constituída pelas isoformas hepática, entérica e óssea) e da

dosagem realizada com a amostra aquecida a 56 °C por 10 minutos, seguindo a mesma sequência de passos descritos acima.

4.11 Aspectos Éticos

Todos os protocolos indicados neste estudo foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, sob o número 21/14. Os pesquisadores envolvidos se esforçaram em reduzir ao mínimo o número de animais utilizados, bem como o sofrimento dos mesmos, de acordo com os princípios éticos para se trabalhar com animais de laboratório.

4.12 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média, e as para comparações entre os grupos foram utilizados Análise de Variância (Anova) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Em todas as situações, foi adotado o nível de significância $p < 0,05$.

O software utilizado para todas as análises foi o GraphPad Prism[®] versão 6.0 e para Mac OS X (La Jolla-CA, EUA), com licença devidamente autorizada.

5 RESULTADOS

5.1 Curva Temporal da Movimentação Dentária Induzida (MDI)

A fim de estabelecer um dia ideal para as abordagens farmacológicas, foi verificado o efeito da MDI nos dias 0, ¼ (6ª hora), 1, 4, 7, 11, 14 e 21. Seguiram-se as análises macroscópica e microscópica, e dosagem da atividade mieloperoxidase do tecido gengival.

A partir das medidas dos espaços entre incisivos e 1º molares superiores registradas antes da instalação da mola e depois, no momento da eutanásia, foi possível obter a quantificação da movimentação dentária da hemiarcada desafiada, em relação à sua contralateral. A figura 12 mostra que a instalação do dispositivo ortodôntico promoveu uma movimentação dentária desde a 6ª hora, sendo significante a partir do 4º dia ($p=0,0216$), mantendo-se nesse nível até o 7º dia ($p=0,0029$), ambos em relação ao ponto inicial da curva (0 dia). Finalmente, a partir do 11º até o 21º dia, a MDI propriamente dita atingiu seus valores máximos, apresentando-se significativamente maiores em relação ao dia 0 ou 1º ($p=0,0022$).

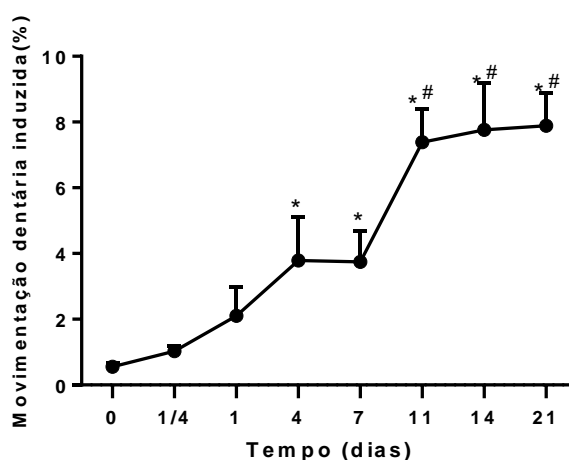


Figura 12. Curva temporal da movimentação dentária nos dias 0, ¼, 1, 4, 7, 11, 14 e 21. A MDI foi realizada pela instalação de uma mola fechada de níquel titânio entre o 1º molar superior esquerdo e incisivos superiores. No dia da colocação da mola e nos dias escolhidos para a eutanásia, as distâncias entre incisivos e primeiros molares superiores esquerdo e direito foram mensuradas, e expressas como percentual de movimentação dentária. Os valores representam a média \pm erro padrão da média da MDI (%) de 6 animais por grupo. (ANOVA e teste de Bonferroni). * $p<0,05$ em relação ao 0 dia; # $p<0,05$ em relação a 1 dia.

Nos respectivos dias das eutanásias dos animais, suas hemiarcadas após removidas e mensuradas, foram processadas para inclusão em parafina. As

imagens vistas nas lâminas foram digitalizadas para a análise histomorfométrica do ligamento periodontal das raízes distovestibular, distolingual e intermediária. Calculou-se, então, uma média aritmética simples dos valores obtidos para determinar a redução, o aumento ou a hialinização das áreas correspondentes ao ligamento periodontal nas hemiarcadas submetidas à MDI e em suas respectivas contralaterais.

Na figura 13, representam-se as áreas do ligamento periodontal no lado de compressão das raízes analisadas em relação à área total do ligamento periodontal. Nas raízes distovestibular (A) e distolingual (B), verificou-se uma redução significativa do ligamento periodontal nos períodos da 6ª hora (1/4 dia), 1º e 4º dias ($p < 0,05$), enquanto que a partir do 7º dia, não houve diferença significativa em relação ao Normal ($p > 0,05$). Entretanto, na raiz intermediária (C), não foram demonstrados resultados significantes em relação a esta área quantificada. Assim, a média das três raízes analisadas (D), confirmou diferença significativa das áreas de pressão na 6ª hora e nos 1º e 4º dias, e a partir do 7º dia não houve diferença significativa dessas áreas em relação ao Normal.

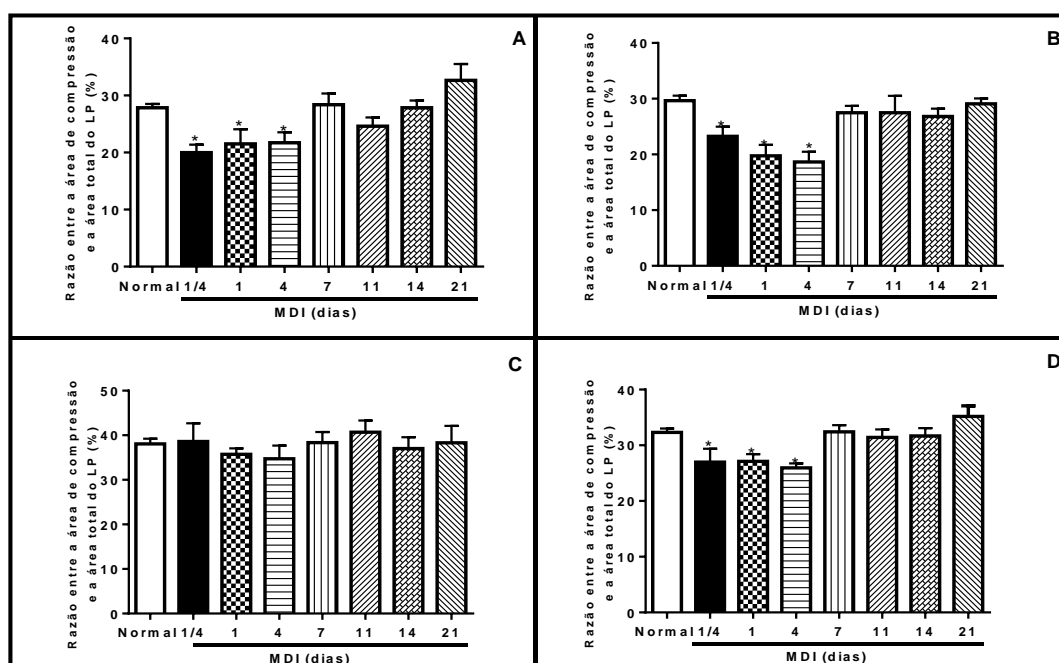


Figura 13. Análise histomorfométrica no lado de compressão do ligamento periodontal nos dias 1, 4, 7, 11, 14 e 21. (A) Raiz distovestibular no lado de compressão; (B) Raiz distolingual; (C) Raiz intermediária; (D) Média dos valores obtidos da histomorfometria das três raízes. Os valores representam a média \pm erro padrão da média da razão entre a área de compressão e a área total do ligamento periodontal. (ANOVA e teste de Bonferroni) $*p < 0,05$ em relação ao Normal.

Na figura 14, representam-se as áreas de tração do ligamento periodontal das raízes analisadas em relação à área total do ligamento periodontal. Nas raízes distovestibular (A) e distolingual (B), houve um aumento significativo na área de tração na 6ª hora e nos 1º e 4º dias, e a partir do 7º dia, o LP não mostrou diferença significativa em relação ao periodonto normal. Entretanto, na raiz intermediária (C), não foram demonstrados resultados significantes em relação a esta área quantificada. Assim, a média das três raízes analisadas (D), confirmou diferença significativa das áreas de tração na 6ª hora e nos 1º e 4º dias, e a partir do 7º dia, não houve diferença significativa dessas áreas em relação ao Normal.

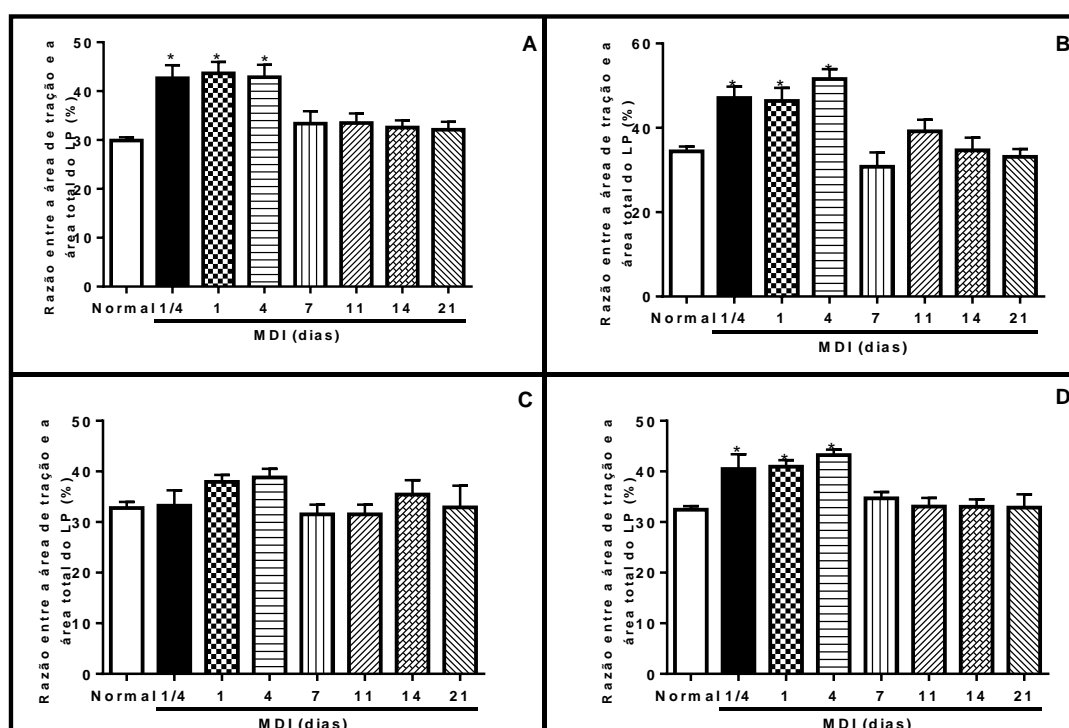


Figura 14. Análise histomorfométrica no lado de tração do ligamento periodontal nos dias 1, 4, 7, 11, 14 e 21. (A) Raiz distovestibular; (B) Raiz distolingual; (C) Raiz intermediária; (D) Média dos valores obtidos da histomorfometria das três raízes no lado de tração. Os valores representam a média \pm erro padrão da média da razão entre a área de tração e a área total do ligamento periodontal. (ANOVA e teste de Bonferroni). * $p < 0,05$ em relação ao Normal.

Na figura 15, representam-se as áreas hialinas do ligamento periodontal das raízes analisadas. Estas áreas estão presentes no lado de compressão do ligamento periodontal e são caracterizadas pela hipóxia e morte celular. Na distovestibular (A), demonstrou-se que a MDI causou um aumento significativo das áreas hialinas a partir da 6ª hora até os 1º e 4º dias em relação ao Normal ($p = 0,0207$; $p = 0,0004$; $p < 0,0001$, respectivamente), retornando à normalidade a partir do

14º dia ($p>0,05$). Na raiz distolingual, foi observado um aumento significativo de áreas hialinas na 6ª hora e nos 1º e 4º dias de MDI, em relação ao Normal ($p=0,0162$; $p=0,0093$; $p=0,0069$, respectivamente), e decaindo a partir do 11º dia ($p=0,0174$). Na raiz intermediária (C), o pico de hialinização ocorre com 1 dia de MDI, começa a decrescer a partir do 4º dia, e normalizando aos 14 dias, em relação aos valores normais. Assim, a média das três raízes analisadas (D), confirmou aumento significativo de áreas hialinas na 6ª hora e nos 1º e 4º dias, decrescendo a partir do 7º dia ($p<0,0001$), e normalizando aos 14 dias. Em todas as raízes analisadas, não houve diferença significativa entre os 14º e 21º dias, e relação à hemiarcada Normal, quanto à presença de áreas hialinas.

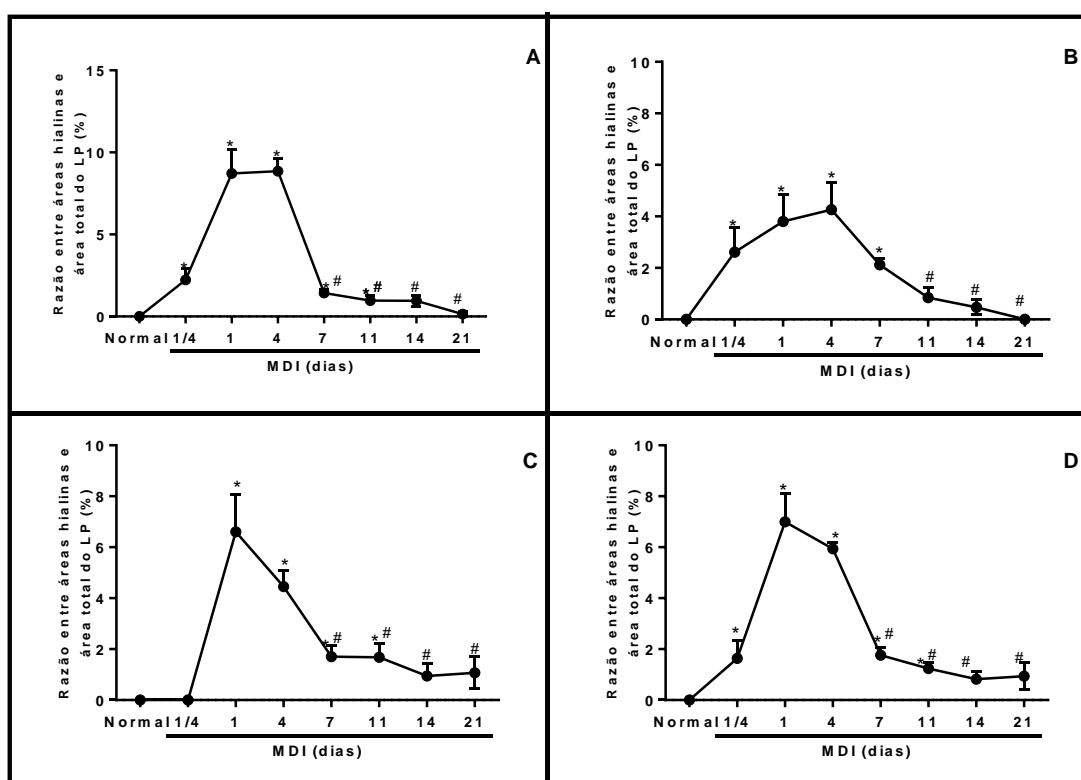


Figura 15. Análise histomorfométrica das áreas hialinas no lado de compressão do ligamento periodontal nos dias 1, 4, 7, 11, 14 e 21. (A) Raiz distovegetal; (B) Raiz distolingual; (C) Raiz intermediária; (D) Média dos valores obtidos da histomorfometria das três raízes no lado de compressão. Os valores representam a média \pm erro padrão da média da razão entre a área de hialina no lado de compressão e a área total do ligamento periodontal. (ANOVA e teste de Bonferroni). * $p<0,05$ em relação ao Normal; # $p<0,05$ em relação a 1 dia.

Analisando-se a histomorfometria nos lados de tração e compressão, bem com as áreas hialinas, concluiu-se que a raiz intermediária deveria prescindir das análises, visto que não foi possível constatar áreas de compressão e tração, de

forma siginificante, quando comparadas às demais raízes, e considerando, ainda, que nas fotomicrografias as raízes distolinguais apareciam, frequentemente, fusionadas às raízes mesiolinguais, o que dificultou sobremaneira o processo de análise, decidiu-se, portanto, para as futuras avaliações conjuntas às abordagens farmacológicas, considerar apenas as raízes distovestibulares como a região ideal para a quantificação histomorfométrica das áreas de compressão, tração e hialinas do ligamento periodontal. De fato, os valores dos referidos parâmetros avaliados na raiz distovestibular muito se assemelham aos valores das médias das três raízes consideradas, porém, de forma muito mais correta.

A figura 16 ilustra as fotomicrografias de cortes transversais de raízes distovestibulares nos diversos períodos analisados na MDI. Observa-se que no ligamento periodontal de uma hemiarcada normal não há a presença de áreas de compressão e tração, ou de áreas hialinas, além da preservação radicular. Após 6 horas de movimentação, observa-se o início do aparecimento das áreas de compressão, tração e de áreas hialinas. Após 1 dia de MDI, nota-se que há áreas de compressão e tração, e formação de áreas hialinas, raiz descentralizada, em relação ao ligamento periodontal, e sem danos em cimento ou dentina. No 4º dia, as raízes também estão descentralizadas, devido à compressão e à tração, além de formação de áreas hialinas mais evidentes. Nessa fase, observa-se uma leve reabsorção cementária. Nos dias 7, 14, 11 e 21, observam-se que as raízes retornam à posição mais centralizadas em relação ao ligamento periodontal, as reabsorções radiculares e ósseas tornam-se mais intensas, porém, observa-se uma franca redução das áreas hialinas.

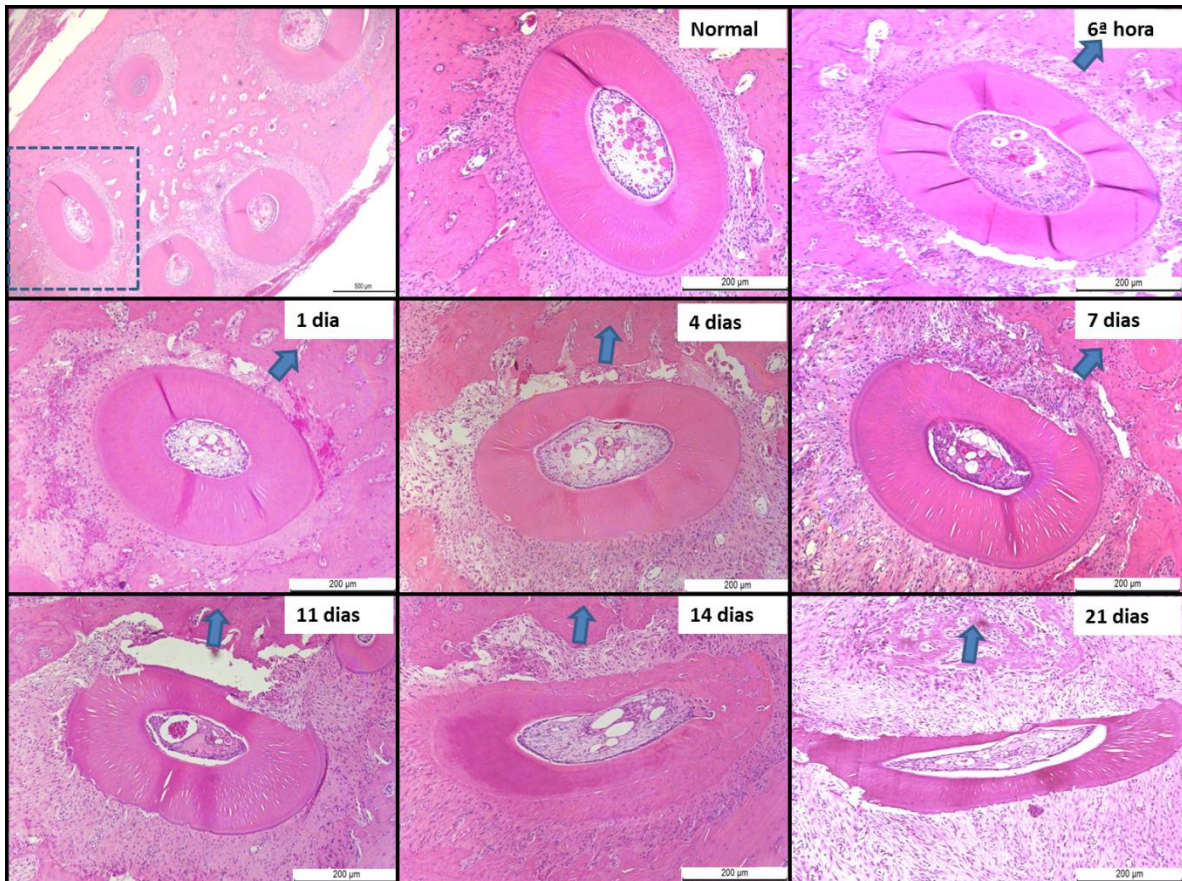


Figura 16. Fotomicrografias dos cortes transversais das raízes distovestibulares. Aspecto de uma raiz normal, e de raízes submetidas a MDI por força única e contínua de 50 gf na 6^a hora e nos dias 1, 4, 7, 11, 14 e 21. As setas azuis indicam direção das forças e as barras indicam 200 μ m. Coloração H&E, 100x de magnitude.

Quanto à atividade de mieloperoxidase, observa-se, na figura 17, que em todos os períodos de MDI analisados houve um aumento significativo da atividade desta enzima, quando comparado ao tecido gengival normal. Observou-se um pico de atividade de MPO na 6^a hora e no 1^o dia, reduzindo para algo em torno de 42% no 4^o dia, e se mantendo aproximadamente nesses níveis até o 21^o dia ($p < 0,05$) após a instalação da mola.

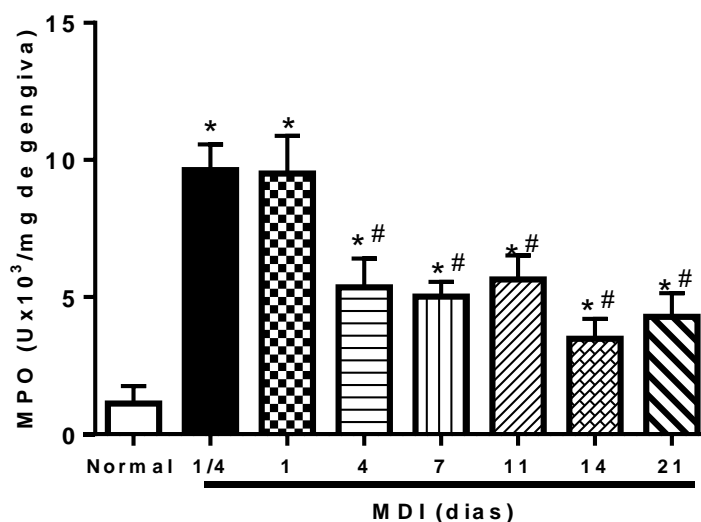


Figura 17. Atividade de mieloperoxidase (MPO) no tecido gengival de animais submetidos à movimentação dentária por 1, 4, 7, 11, 14 e 21 dias. Imediatamente após a eutanásia dos animais, amostras de tecido gengival subjacente à área desafiada, bem como das contralaterais (Normais) foram removidas e processadas para análise da atividade de mieloperoxidase. Os valores representam a média \pm erro padrão da quantificação de MPO ($U \times 10^3$ /mg de tecido) (Anova e teste de Bonferroni). * $p < 0,05$ em relação ao Normal; # $p < 0,05$ em relação a 1 dia.

Considerando os resultados anteriores em conjunto, onde se observou um pico de movimentação dentária a partir do 11^o dia, atingindo um platô até o 21^o dia de MDI, e microscopicamente, também nesse período as raízes retornaram à posição mais centralizada no ligamento periodontal e apresentaram maiores reabsorções, o que culminou em franco processo de remodelação óssea. Assim, optou-se por definir o período de 11 dias como o ideal para se avaliar as diferentes abordagens farmacológicas.

5.2 Abordagens farmacológicas

5.2.1 Análise macroscópica

A figura 18A ilustra o efeito da instalação da mola entre molares e incisivos superiores durante 11 dias, onde se observa intensa movimentação dentária em decorrência da mesialização dos molares em resposta à força aplicada ao dispositivo ortodôntico. Considerando-se que, concomitantemente à mesialização dos molares desafiados, ocorre a palatinização dos incisivos, as medidas obtidas entre molares e incisivos no lado desafiado, foram, então, subtraídas das respectivas medidas contralaterais, nas quais ocorrem apenas palatinização dos incisivos, com os molares fixos na hemiarcada. A ATV, administrada profilaticamente durante 17 dias, e por mais 11 dias terapêuticamente após a MDI, perfazendo 28 dias de tratamento, quando então, nas doses de 1 e 3 mg/kg, causou uma redução significativa da MDI, quando comparada ao grupo controle (H_2O_d), em 32% e 51%, respectivamente ($p < 0,05$). De maneira interessante, a maior dose de ATV, 9 mg/kg, impediu completamente o curso da movimentação, quando comparada aos valores normais ($p > 0,05$).

A figura 18B ilustra que a administração semanal do alendronato, nas doses de 1 e 7 mg/kg, foi capaz de reduzir, de forma significativa e dose-dependente, a MDI, quando comparada à de animais controle, sendo que a maior dose anulou completamente tal movimentação ($p > 0,05$).

Considerando o mecanismo de ação comum a ambos os fármacos, buscou-se avaliar se a combinação das menores doses de ambos os fármacos, ATV e ALD, seria suficientemente capaz de potencializar a redução da MDI, quando comparada a esses fármacos isoladamente. Os resultados obtidos (figura 18C) mostraram que a combinação de doses de atorvastatina e alendronato reduziram o a movimentação dentária induzida de forma significativa, mas não houve um efeito sinérgico. Entretanto, a combinação teve um efeito aditivo, em relação a administração de atorvastatina isoladamente.

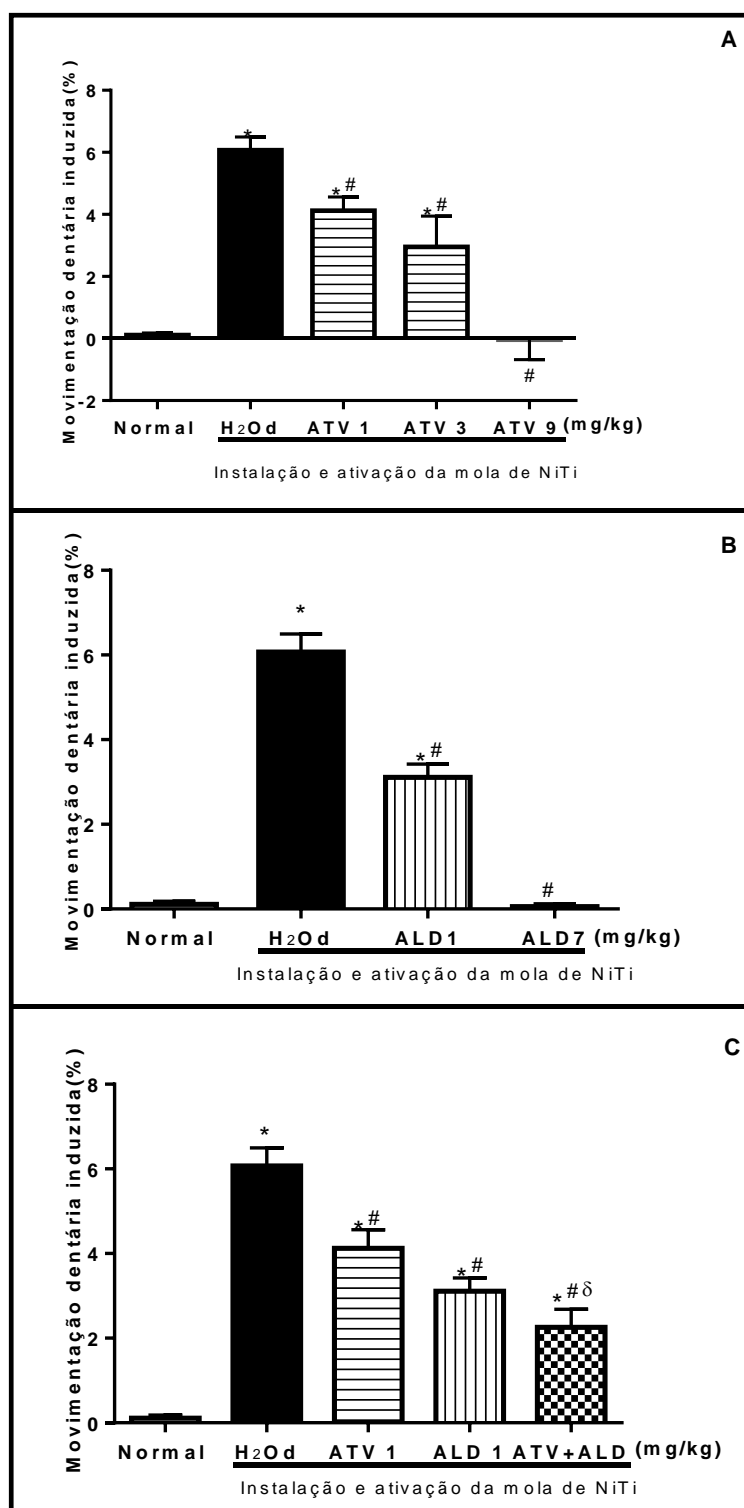


Figura 18. Efeito da atorvastatina (ATV), do alendronato (ALD), e da combinação ATV + ALD na movimentação dentária induzida (MDI) em ratos. Os animais receberam diariamente atorvastatina nas doses de 1, 3 e 9 mg/kg; alendronato nas doses de 1 e 7 mg/kg semanalmente; ou combinação das menores doses de ambos os fármacos. A MDI foi obtida considerando a distância entre incisivos e molares antes da instalação da mola e na eutanásia. Os valores representam a média \pm erro padrão da média da MDI (%). (Anova e teste de Bonferroni). * $p < 0,05$ em relação ao Normal; # $p < 0,05$ em relação ao H₂O. ^δ $p < 0,05$ em relação a ATV 1.

5.2.2 Análise histomorfométrica

No 11^o dia de MDI e 28^o de tratamento, analisou-se o ligamento periodontal histomorfometricamente, considerando a razão entre as áreas limitadas por um ângulo de 120^o nos lados de compressão e de tração da raiz distovestibular. Observa-se na figura 19 (A, B) que não houve alteração na redução e aumento do ligamento periodontal, quando os animais foram submetidos à MDI por 11 dias. Ainda, a administração de atorvastatina de 1, 3 e 9 mg/kg não demonstrou influenciar na quantificação dessas áreas, em relação à hemiarcada normal. A figura 19 (C, D) mostra que não houve alteração no ligamento periodontal nas áreas de pressão e tração, quando os animais foram submetidos à MDI por 11 dias e receberam alendronato nas doses de 1 e 7 mg/kg, em relação ao Normal. De forma semelhante, a administração da combinação de atorvastatina e alendronato também não interferiu no aparecimento de áreas de compressão e de tração do ligamento periodontal, quando comparado ao Normal (E,F).

Na figura 20 demonstra-se as áreas hialinas dos animais submetidos à MDI e que receberam atorvastatina (A), alendronato (B) e a combinação de ambos os fármacos (C). Os animais submetidos à MDI e que receberam H₂O_d ou ATV mostraram um aumento significativo de áreas hialinas em relação ao Normal. No entanto, a ATV nas três doses foi capaz de reduzir de forma significativa estas áreas quando comparado ao grupo H₂O_d. Quanto aos efeitos do alendronato, observou-se que o fármaco na maior dose promoveu uma redução ($p < 0,05$) em relação ao grupo H₂O_d. O mesmo decréscimo destas áreas ocorreu quando ambos os fármacos foram combinados.

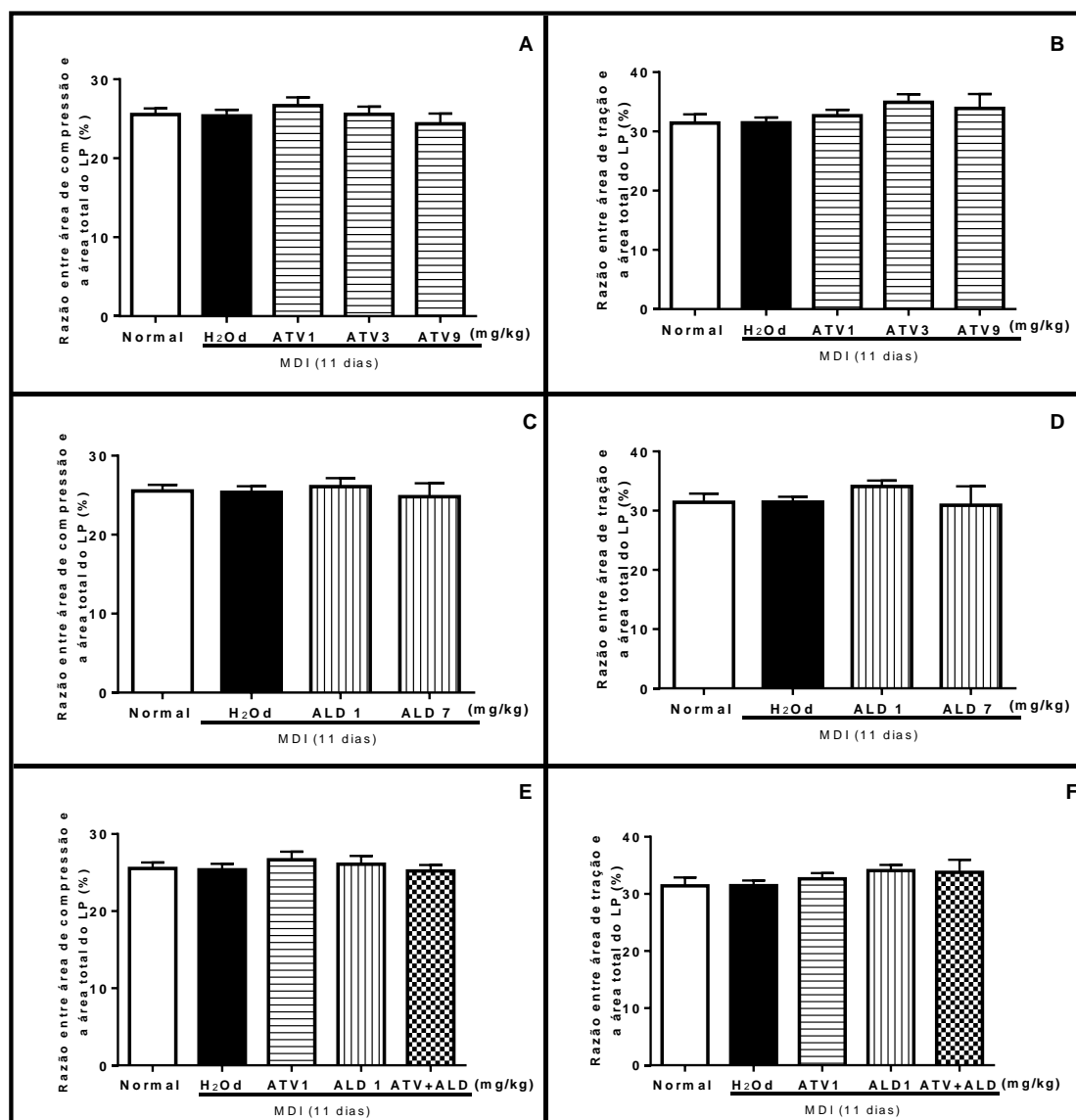


Figura 19. Efeito da atorvastatina (ATV), do alendronato (ALD), e da combinação ATV + ALD na análise histomorfométrica. Os animais receberam diariamente atorvastatina nas doses de 1, 3 e 9 mg/kg; alendronato nas doses de 1 e 7 mg/kg semanalmente; ou combinação das menores doses de ambos os fármacos. Para a quantificação da redução e aumento do ligamento periodontal, foi calculada a razão entre a área de compressão ou tração, e a área total do ligamento (Anova e Teste de Bonferroni).

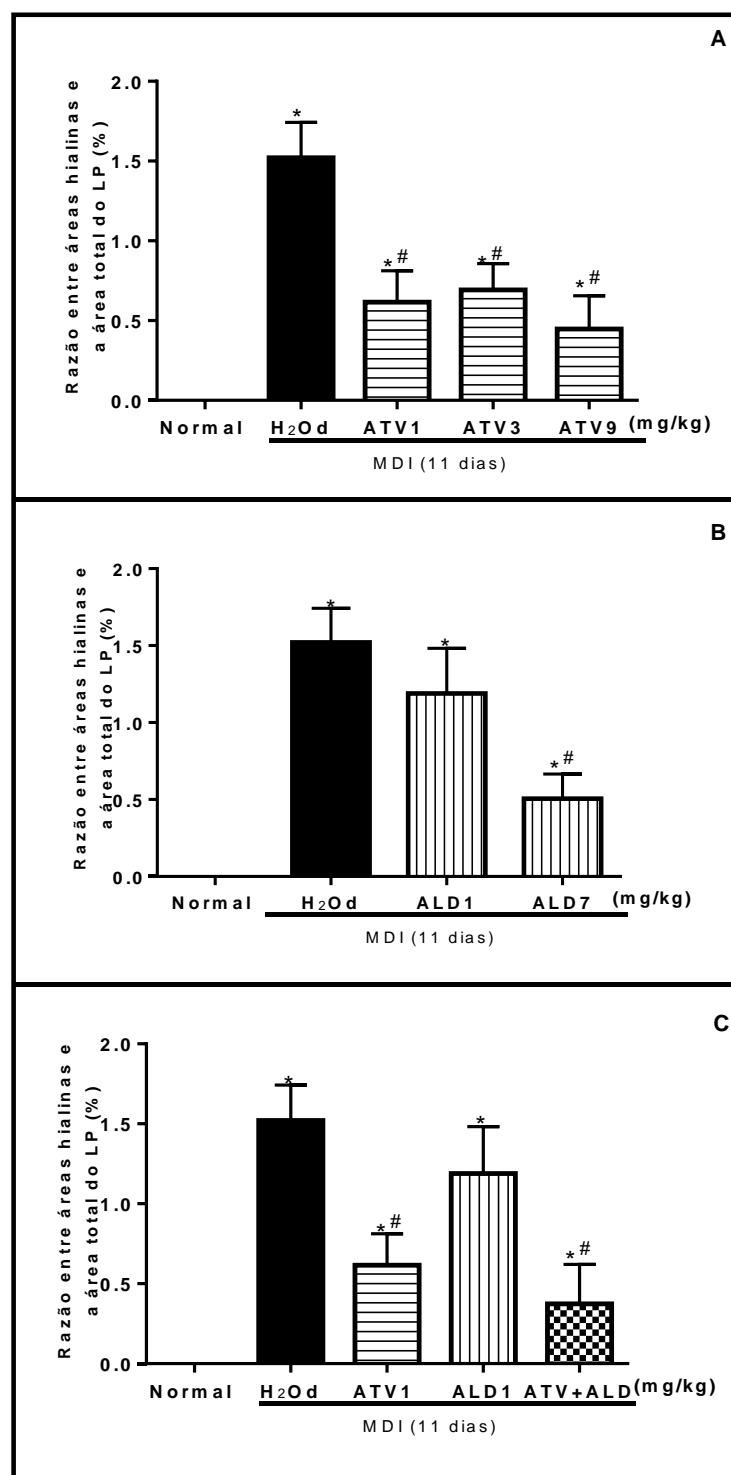


Figura 20. Efeito da atorvastatina (ATV), do alendronato (ALD), e da combinação ATV + ALD na análise histomorfométrica das áreas hialinas. Os animais receberam diariamente atorvastatina nas doses de 1, 3 e 9 mg/kg; alendronato nas doses de 1 e 7 mg/kg semanalmente; ou combinação das menores doses de ambos os fármacos. (A) Quantificação de áreas hialinas de animais submetidos à MDI, recebendo H₂O_d e ATV. (B) Quantificação de áreas hialinas de animais submetidos à MDI, recebendo H₂O_d e ALD. (C) Quantificação de áreas hialinas de animais submetidos à MDI, recebendo ATV 1 mg/kg, ALD 1 mg/kg e sua combinação. Para a quantificação das áreas hialinas, estas foram delimitadas no ligamento periodontal, e foi obtida uma razão entre estas áreas e a área total do ligamento periodontal (Anova e Teste de Bonferroni). *p<0,05 em relação ao Normal; #p<0,05 em relação ao H₂O_d.

5.2.3 Análise histológica

Na figura 21 (A), é possível observar um desenho esquemático, em que se identifica a estruturas observadas nas fotomicrografias. A figura 21 (B) ilustra a raiz distovestibular de uma hemiarcada normal. Observa-se a preservação do osso alveolar, bem como da dentina e cimento radicular. Os animais submetidos à movimentação dentária induzida e que receberam apenas H₂O_d demonstraram uma reabsorção óssea alveolar do lado de pressão, bem como uma reabsorção dentinária e cementária (C). Entretanto, a administração de atorvastatina 1, 3 e 9 mg/kg resultou em uma maior estabilidade do osso e da raiz (D, E, F).

Em relação à administração de alendronato, constatou-se que as doses de 1 e 7 mg/kg promoveram uma maior proteção dos efeitos da movimentação dentária induzida na raiz, e principalmente, no osso alveolar (G, H). Resultados semelhantes foram obtidos na administração das menores doses de atorvastatina e alendronato (I).

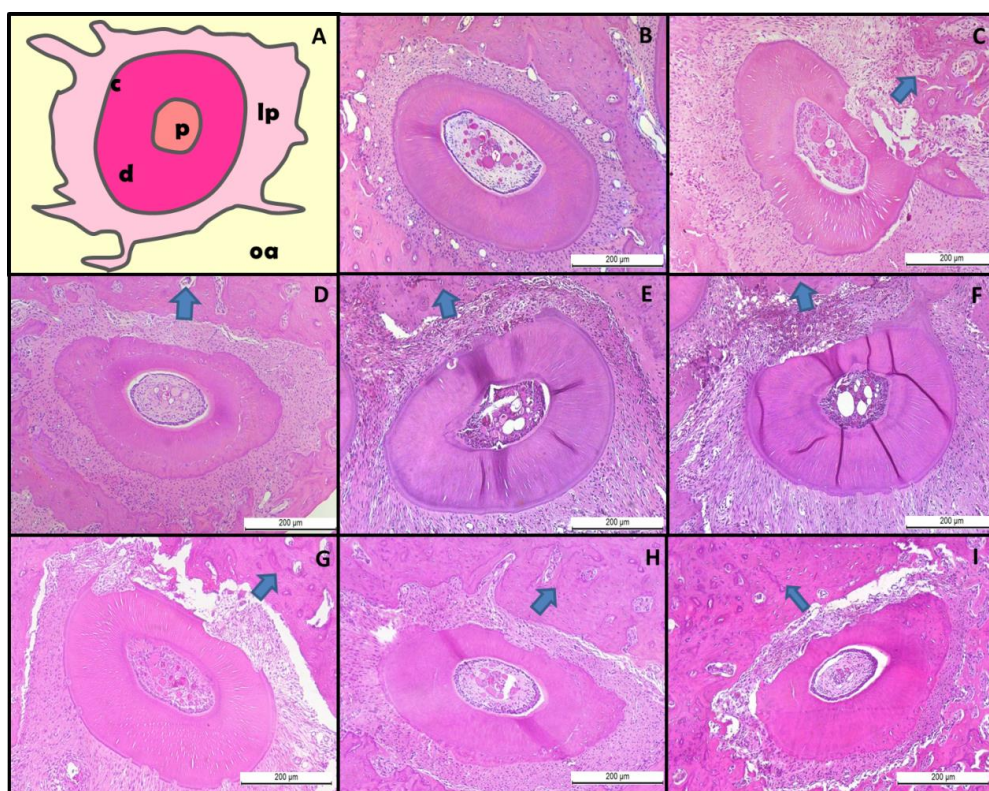


Figura 21. Fotomicrografias dos cortes transversais das raízes distovestibulares. (A) Esquema das estruturas das raízes: ligamento periodontal (lp), dentina (d), polpa (p), osso alveolar (oa), cimento (c); (B) Raiz de hemiarcada normal; (C) Raízes de hemiarcadas de animais submetidos à MDI e recebendo H₂O_d ou (D) tratamentos com ATV 1 mg/kg; ATV 3 mg/kg (E); ATV 9 mg/kg (F); ALD 1 mg/kg (G); ALD 7 mg/kg (H) e ATV + ALD (I). Coloração HE. As barras indicam 200 µm. Magnitude de 100x. As setas azuis indicam a direção de 50 gf.

5.2.4 Atividade de mieloperoxidase

Observa-se na figura 22 (A) que a instalação da mola por 11 dias aumentou a atividade de MPO no tecido gengival, em relação ao tecido gengival normal. No entanto, a administração de atorvastatina na dose de 9 mg/kg foi capaz de reduzir esta atividade em 56%. Em relação ao alendronato, constatou-se que as doses de 1 e 7 mg/kg não foram capazes de reduzir a atividade de mieloperoxidase em relação ao grupo H₂O_d (figura 22B). A combinação de menores doses de atorvastatina e alendronato também não atenuou a atividade de mieloperoxidase (figura 22C).

5.2.5 Detecção de níveis de IL-1 β por ELISA

Observa-se na figura 23 (A) que a MDI realizada durante 11 dias promoveu um aumento nos níveis de IL-1 β no tecido gengival, em relação ao Normal, e a dose de 9 mg/kg de ATV foi capaz de reduzir esses níveis de forma significativa em 34%. Na figura 23 (B) nota-se que a dose de 1 mg/kg de ALD reduziu significativamente a quantificação dessa citocina, entretanto a dose de 7 mg/kg de ALD não promoveu este efeito. Quando as menores doses de atorvastatina e alendronato foram combinadas entre si, observou-se que os animais submetidos à MDI e que tal combinação obtiveram um decréscimo significativo nos níveis de IL-1 β , quando comparado ao grupo H₂O_d (Figura 23C).

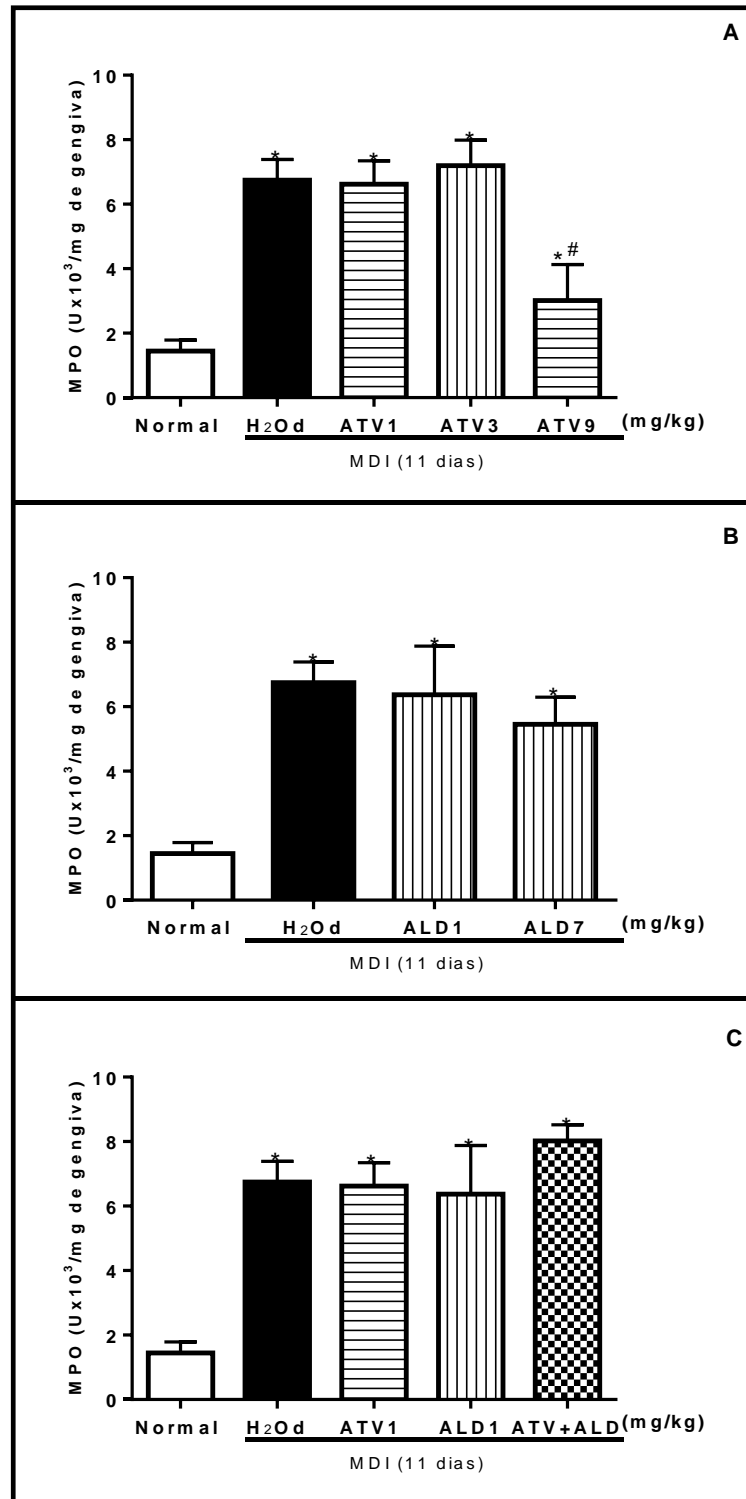


Figura 22. Atividade de mieloperoxidase no tecido gengival de hemiarçadas normais e submetidas à movimentação dentária. Os animais receberam H₂O_d, ATV 1, 3 e 9 mg/kg (A); ALD 1 e 7 mg/kg (B); ATV 1 mg/kg, ALD 1 mg/kg e sua combinação (C). Na eutanásia, amostras de tecido gengival subjacente à área desafiada, bem como a contralaterais (Normais) foram removidas para análise da atividade de mieloperoxidase. Os valores representam a média \pm erro padrão da quantificação de MPO ($U \times 10^3 / \text{mg}$ de tecido) (Anova e teste de Bonferroni). * $p < 0,05$ em relação ao Normal; # $p < 0,05$ em relação ao H₂O_d.

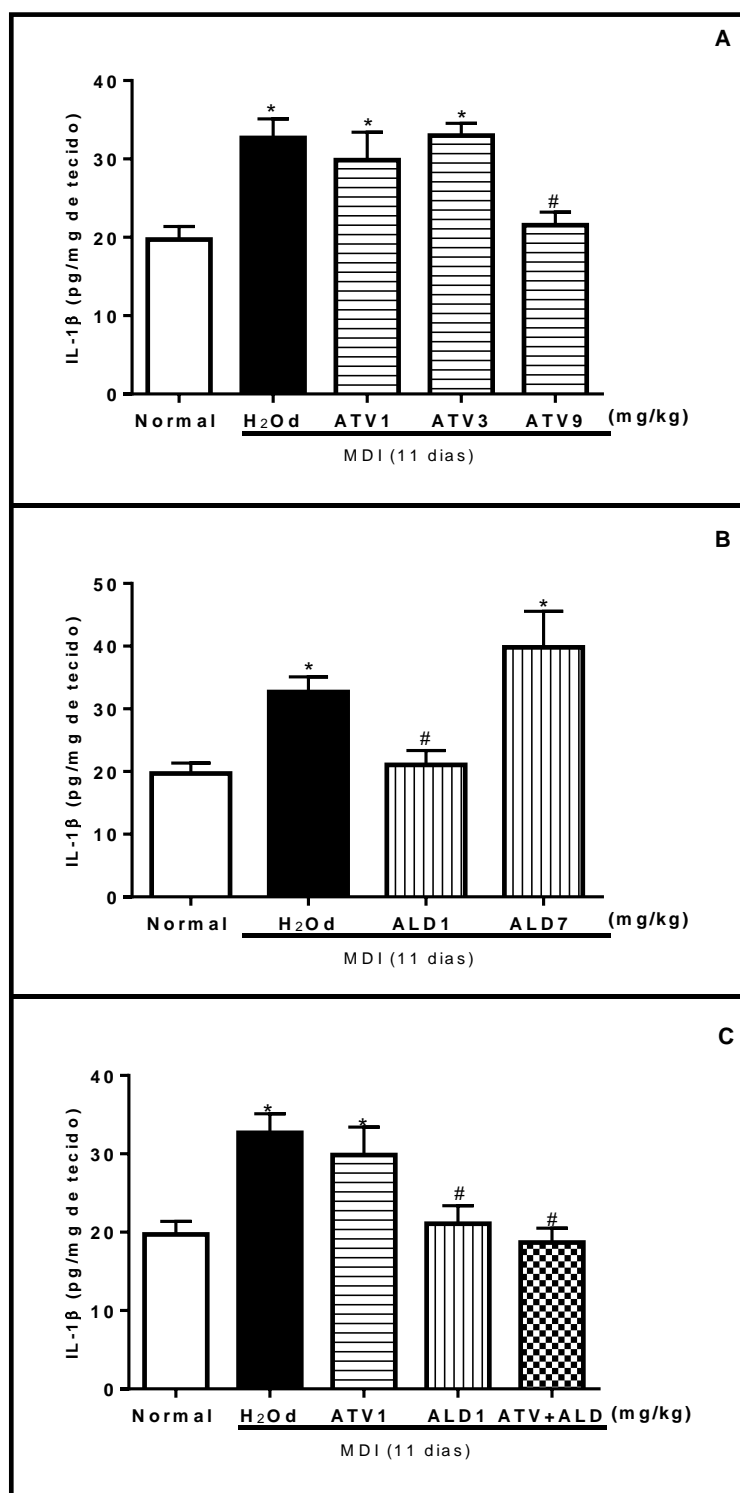


Figura 23. Níveis de IL-1 β no tecido gengival de hemiarcadas normais e submetidas à movimentação dentária dos animais. Os animais receberam H₂O_d, ATV 1, 3 e 9 mg/kg (A); ALD 1 e 7 mg/kg (B); ATV 1 mg/kg, ALD 1 mg/kg e sua combinação (C). Na eutanásia, amostras de tecido gengival subjacente à área desafiada, bem como a contralaterais (Normais) foram removidas para detecção de IL-1 β . Os valores representam a média \pm erro padrão da quantificação IL-1 β (pg/mg de tecido) (Anova e teste de Bonferroni). * $p < 0,05$ em relação ao Normal; # $p < 0,05$ em relação ao H₂O_d.

5.2.6 Análise imunohistoquímica

As figuras 24, 25 e 26 mostram as imunomarcações para RANKL em cortes transversais das raízes distovestibulares. Observou-se que o periodonto normal, não submetido à MDI, não apresentou imunomarcação intensa para o anticorpo (figuras 24 A, B; 25 A, B e 26 A, B), enquanto os animais submetidos à MDI e que receberam apenas H₂O_d apresentaram um periodonto com intensas imunomarcações (figuras 24 C, D; 25 C, D e 26 C, D). ATV nas três doses, principalmente as doses de 3 e 9 mg/kg, foi capaz de reduzir essas imunomarcações, quando comparado aos animais que receberam apenas H₂O_d (ATV1, figura 24 E, F; ATV3, figura 24 G, H; ATV9, figura 24 I, J). ALD 1 e 7 mg/kg também promoveram um decréscimo na detecção de marcações no periodonto, quando comparado aos animais H₂O_d (ALD1, figura 25 E, F; ALD7, figura 25 G, H). Resultados semelhantes foram encontrados, quando se combinou as menores doses de ATV e ALD (ATV+ALD, figura 26 E, F).

As figuras 27, 28 e 29 mostram as imunomarcações para OPG. Observou-se que o periodonto de animais normais apresentava um aumento no número dessas marcações (figuras 27 A, B; 28 A, B e 29 A, B) em relação ao grupo submetido à MDI e que recebeu apenas H₂O_d (figuras 27 C, D, 28 C, D e 29 C, D). Ainda, ATV (ATV1, figura 27 E, F; ATV3, figura 27 G, H; ATV9, figura 27 I, J), ALD (ALD1, figura 28 E, F; ALD7, figura 28 G, H) e sua combinação (ATV+ALD, figura 29 E, F) foram capazes de promover o aumento da marcação de OPG em relação ao grupo H₂O_d.

Adicionalmente, nas figuras 30, 31 e 32, demonstram-se as imunomarcações para TRAP. Observou-se que o periodonto submetido à MDI (figuras 30 C, D; 31 C, D e 32 C, D) apresenta uma intensa marcação para esse anticorpo em relação ao periodonto normal (figuras 30 A, B; 31 A, B e 32 A, B). Complementando os achados para RANKL, observou-se que os tratamentos com ATV (ATV1, figura 30 E, F; ATV3, figura 30 G, H; ATV9, figura 30 I, J), ALD (ALD1, figura 31 E, F; ALD7, figura 31 G, H) e sua combinação (ATV+ALD, figura 32 E, F) promoveram uma modulação para a atividade de osteoclastos, uma vez que reduziram a imunomarcação para TRAP.

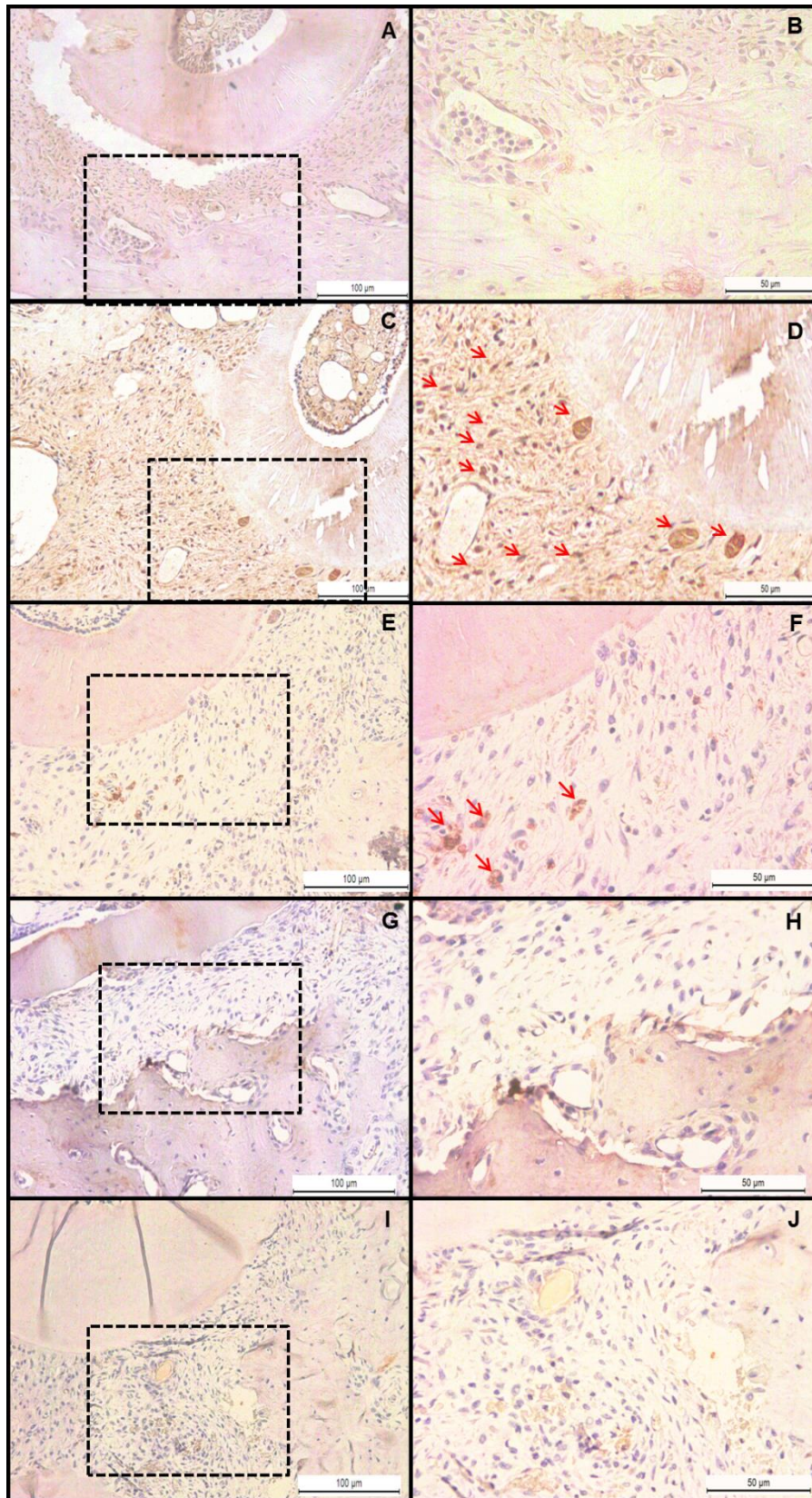


Figura 24. Efeito da ATV sobre a marcação imunohistoquímica de RANKL após 11 dias de MDI. (A, B) Raiz DV de hemiarcada normal, não submetidas à MDI; Raízes DV de hemiarcadas submetidas à MDI recebendo apenas água destilada (C, D – H₂O_d; 2 ml/kg), (E, F) ATV 1mg/kg, (G, H) ATV 3 mg/kg, (I, J) ATV 9 mg/kg. Após 11 dias de MDI, os animais foram eutanasiados. As setas vermelhas demonstram marcação imunohistoquímica, (A, C, E, G, I) aumento de 200x; (B, D, F, H, J) aumento de 400x, cujas barras indicam 100 µm e 50 µm, respectivamente.

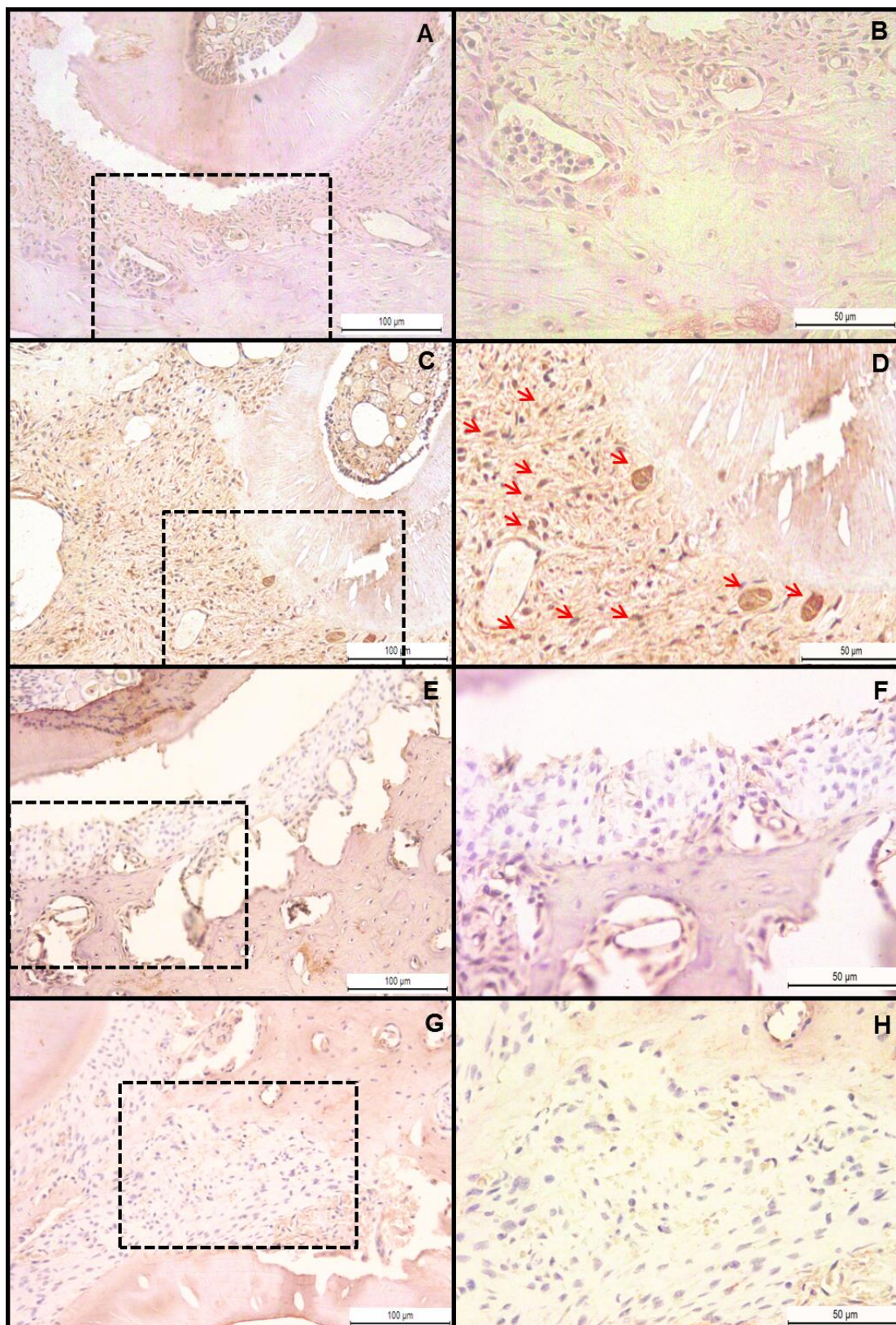


Figura 25. Efeito de ALD sobre a marcação imunohistoquímica de RANKL após 11 dias de MDI. (A, B) Raiz DV de hemiarcada normal, não submetidas à MDI; Raízes DV de hemiarcadas submetidas à MDI recebendo apenas água destilada (C, D – H₂O_d; 2 ml/kg), (E, F) ALD 1mg/kg, (G, H) ALD 7 mg/kg. Após 11 dias de MDI, os animais foram eutanasiados. As setas vermelhas demonstram marcação imunohistoquímica, (A, C, E, G) aumento de 200x; (B, D, F, H) aumento de 400x, cujas barras indicam 100 μm e 50 μm, respectivamente.

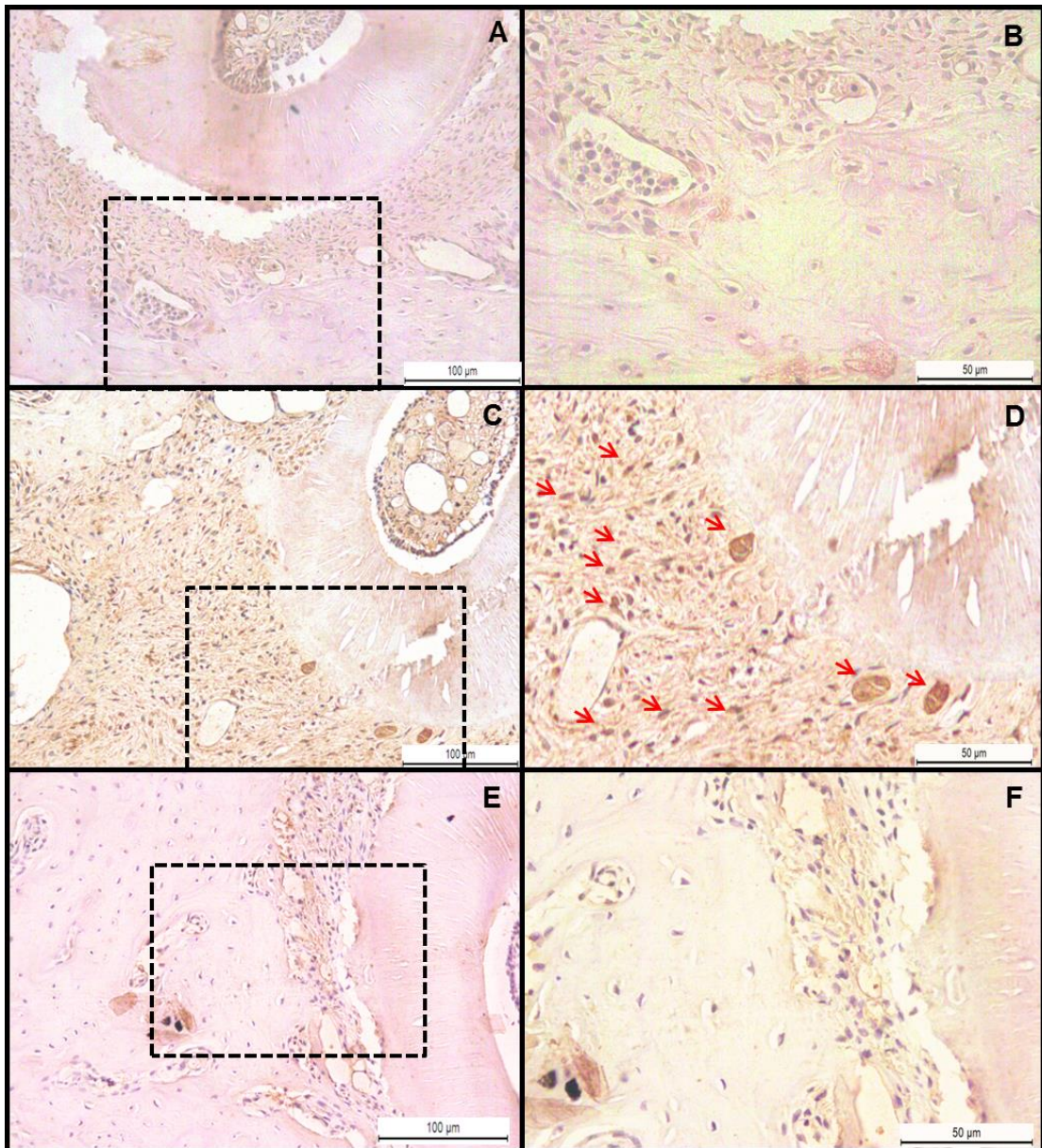


Figura 26. Efeito de ATV+ALD sobre a marcação imunohistoquímica de RANKL após 11 dias de MDI. (A, B) Raiz DV de hemiarcada normal, não submetidas à MDI; Raízes DV de hemiarcadas submetidas à MDI recebendo apenas água destilada (C, D – H₂O_d; 2 ml/kg), (E, F) ALD + ATV. Após 11 dias de MDI, os animais foram eutanasiados. As setas vermelhas demonstram marcação imunohistoquímica, (A, C, E) aumento de 200x; (B, D, F) aumento de 400x, cujas barras indicam 100 μm e 50 μm, respectivamente.

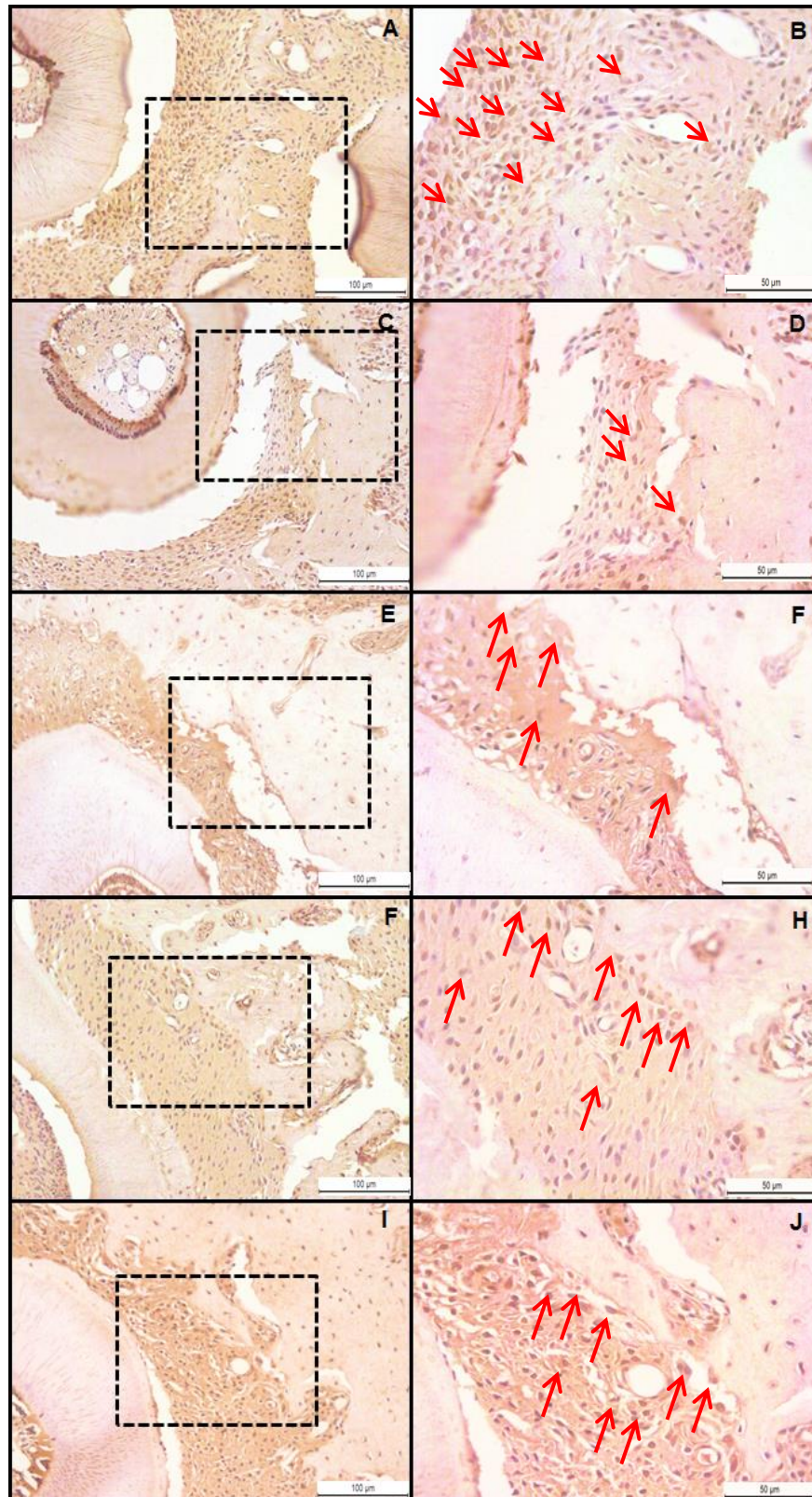


Figura 27. Efeito da ATV sobre a marcação imunohistoquímica de OPG após 11 dias de MDI. (A, B) Raiz DV de hemiarcada normal, não submetidas à MDI; Raízes DV de hemiarcadas submetidas à MDI recebendo apenas água destilada (C, D – H₂O; 2 ml/kg), (E, F) ATV 1mg/kg, (G, H) ATV 3 mg/kg, (I, J) ATV 9 mg/kg. Após 11 dias de MDI, os animais foram eutanasiados. As setas vermelhas demonstram marcação imunohistoquímica, (A, C, E, G, I) aumento de 200x; (B, D, F, H, J) aumento de 400x, cujas barras indicam 100 μm e 50 μm, respectivamente.

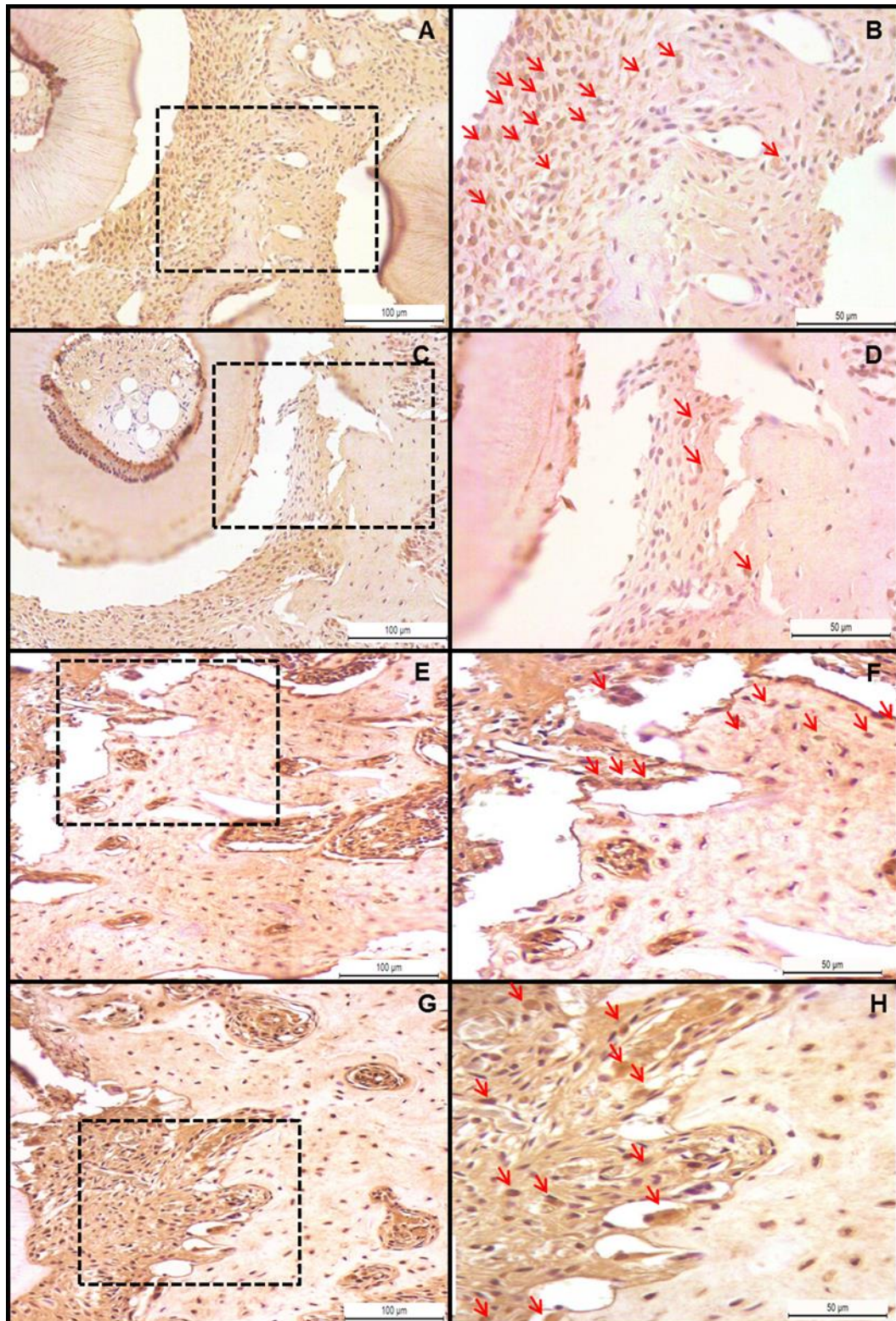


Figura 28. Efeito de ALD sobre a marcação imunohistoquímica de OPG após 11 dias de MDI. (A, B) Raiz DV de hemiarca normal, não submetidas à MDI; Raízes DV de hemiarcas submetidas à MDI recebendo apenas água destilada (C, D – H₂O; 2 ml/kg), (E, F) ALD 1 mg/kg, (G, H) ALD 7 mg/kg. Após 11 dias de MDI, os animais foram eutanasiados. As setas vermelhas demonstram marcação imunohistoquímica, (A, C, E, G) aumento de 200x; (B, D, F, H) aumento de 400x, cujas barras indicam 100 µm e 50 µm, respectivamente.

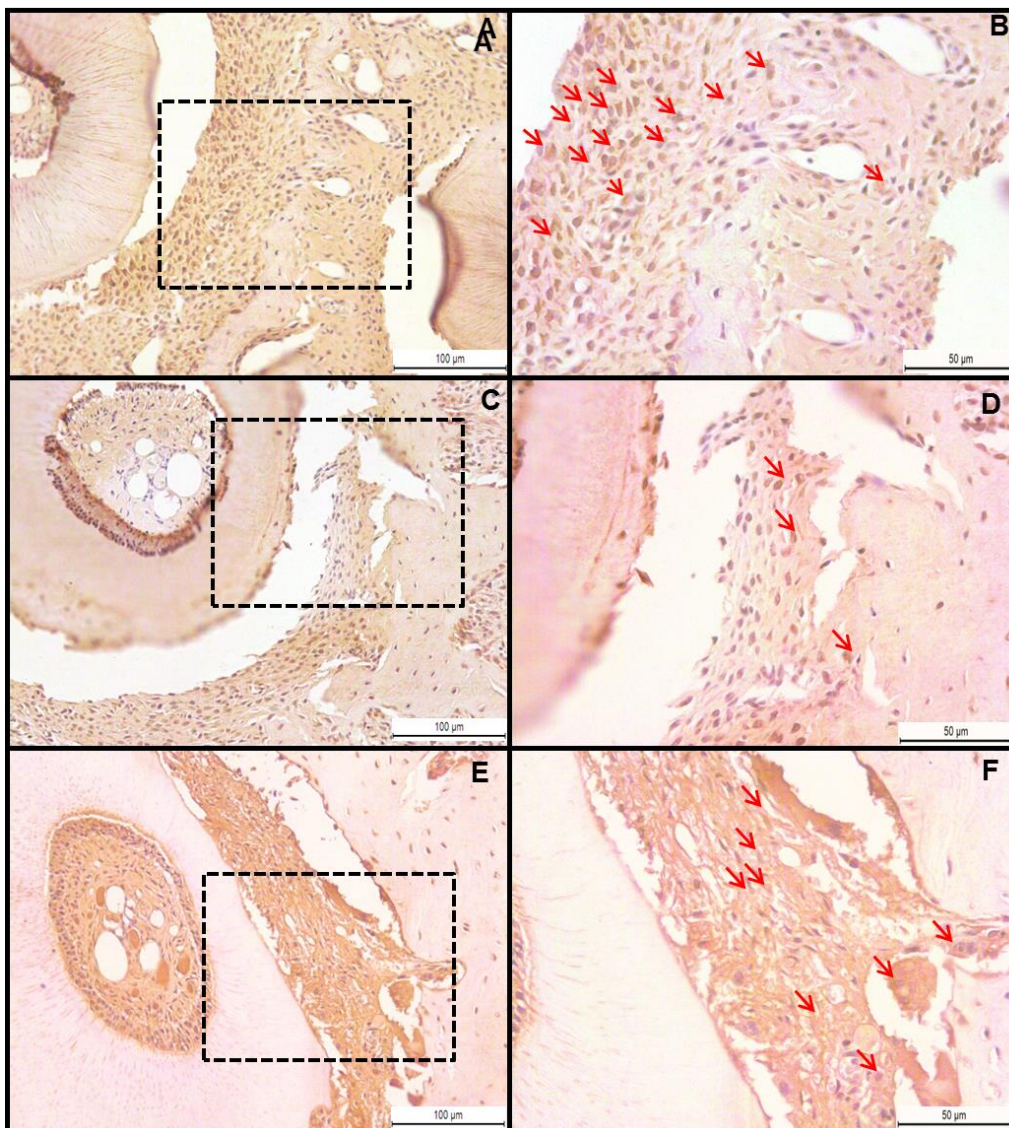


Figura 29. Efeito de ATV+ALD sobre a marcação imunohistoquímica de RANKL após 11 dias de MDI. (A, B) Raiz DV de hemiarcada normal, não submetidas à MDI; Raízes DV de hemiarcadas submetidas à MDI recebendo apenas água destilada (C, D – H₂O_d; 2 ml/kg), (E, F) ALD + ATV. Após 11 dias de MDI, os animais foram eutanasiados. As setas vermelhas demonstram marcação imunohistoquímica, (A, C, E) aumento de 200x; (B, D, F) aumento de 400x, cujas barras indicam 100 µm e 50 µm, respectivamente.

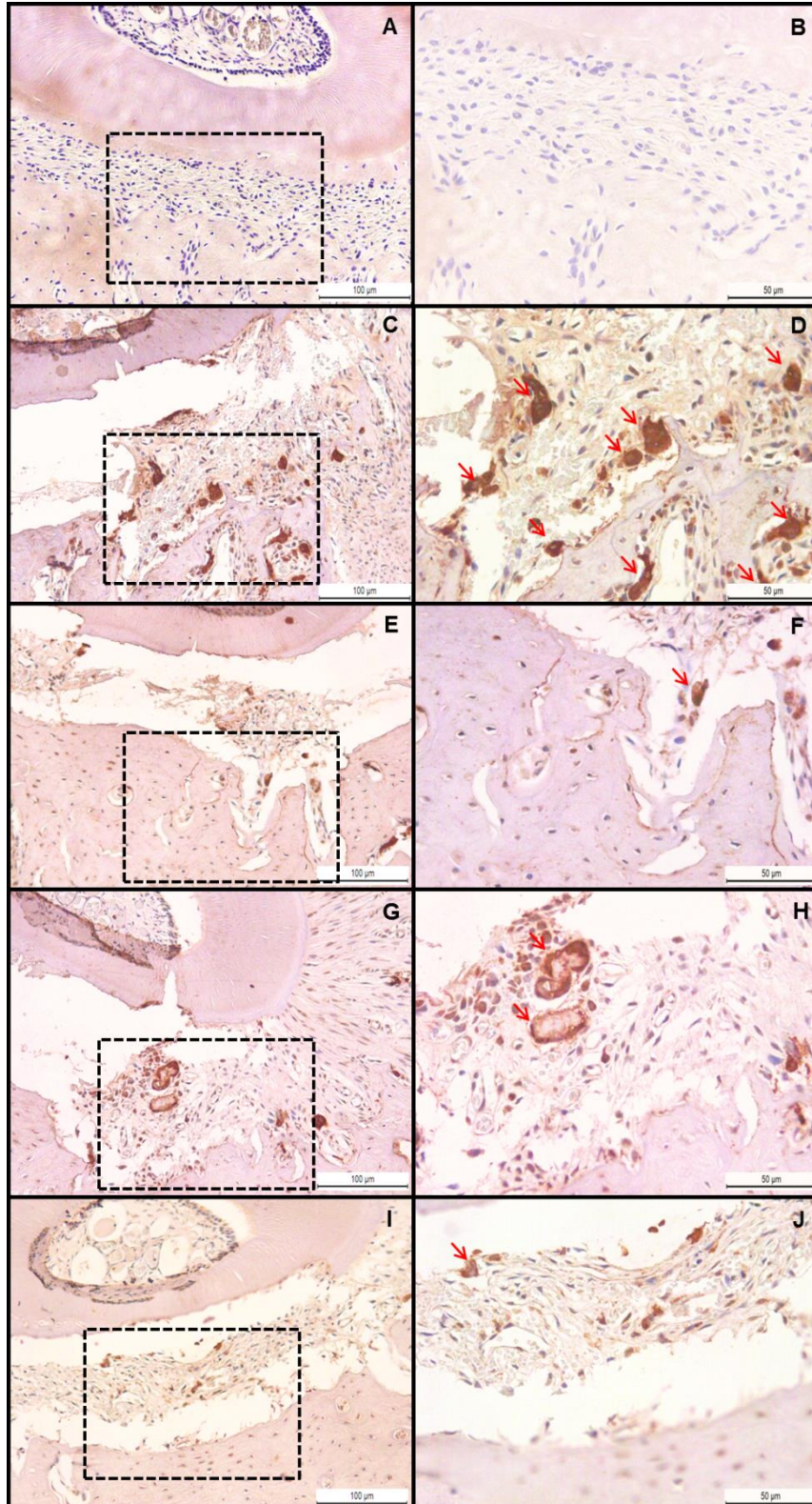


Figura 30. Efeito da ATV sobre a marcação imunohistoquímica de TRAP após 11 dias de MDI. (A, B) Raiz DV de hemiarcada normal, não submetidas à MDI; Raízes DV de hemiarcadas submetidas à MDI recebendo apenas água destilada (C, D – H₂O_d; 2 ml/kg), (E, F) ATV 1mg/kg, (G, H) ATV 3 mg/kg, (I, J) ATV 9 mg/kg. Após 11 dias de MDI, os animais foram eutanasiados. As setas vermelhas demonstram marcação imunohistoquímica, (A, C, E, G, I) aumento de 200x; (B, D, F, H, J) aumento de 400x, cujas barras indicam 100 µm e 50 µm, respectivamente.

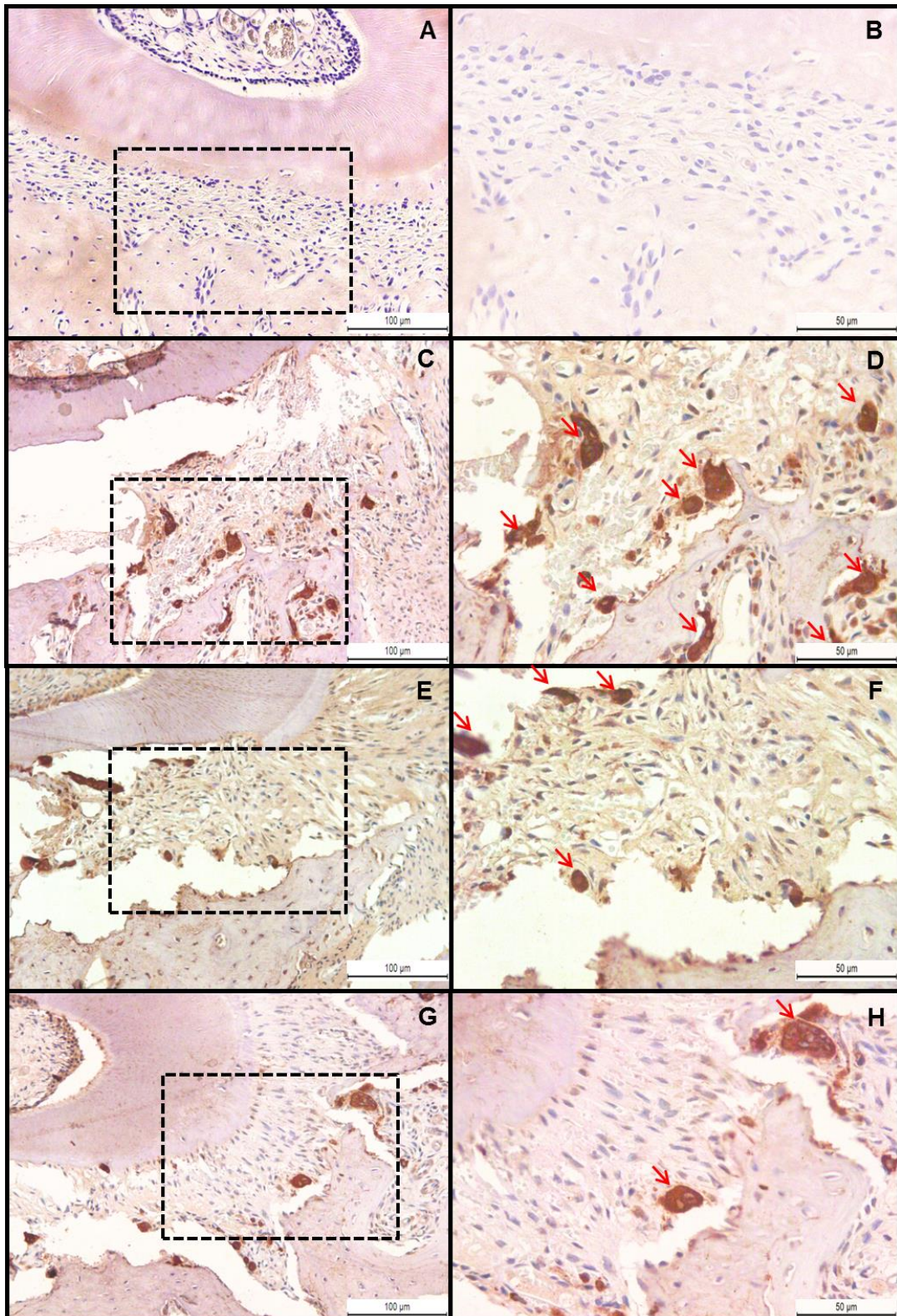


Figura 31. Efeito de ALD sobre a marcação imunohistoquímica de TRAP após 11 dias de MDI. (A, B) Raiz DV de hemiarcada normal, não submetidas à MDI; Raízes DV de hemiarcadas submetidas à MDI recebendo apenas água destilada (C, D – H₂O_d; 2 ml/kg), (E, F) ALD 1 mg/kg, (G, H) ALD 7 mg/kg. Após 11 dias de MDI, os animais foram eutanasiados. As setas vermelhas demonstram marcação imunohistoquímica, (A, C, E, G) aumento de 200x; (B, D, F, H) aumento de 400x, cujas barras indicam 100 µm e 50 µm, respectivamente.

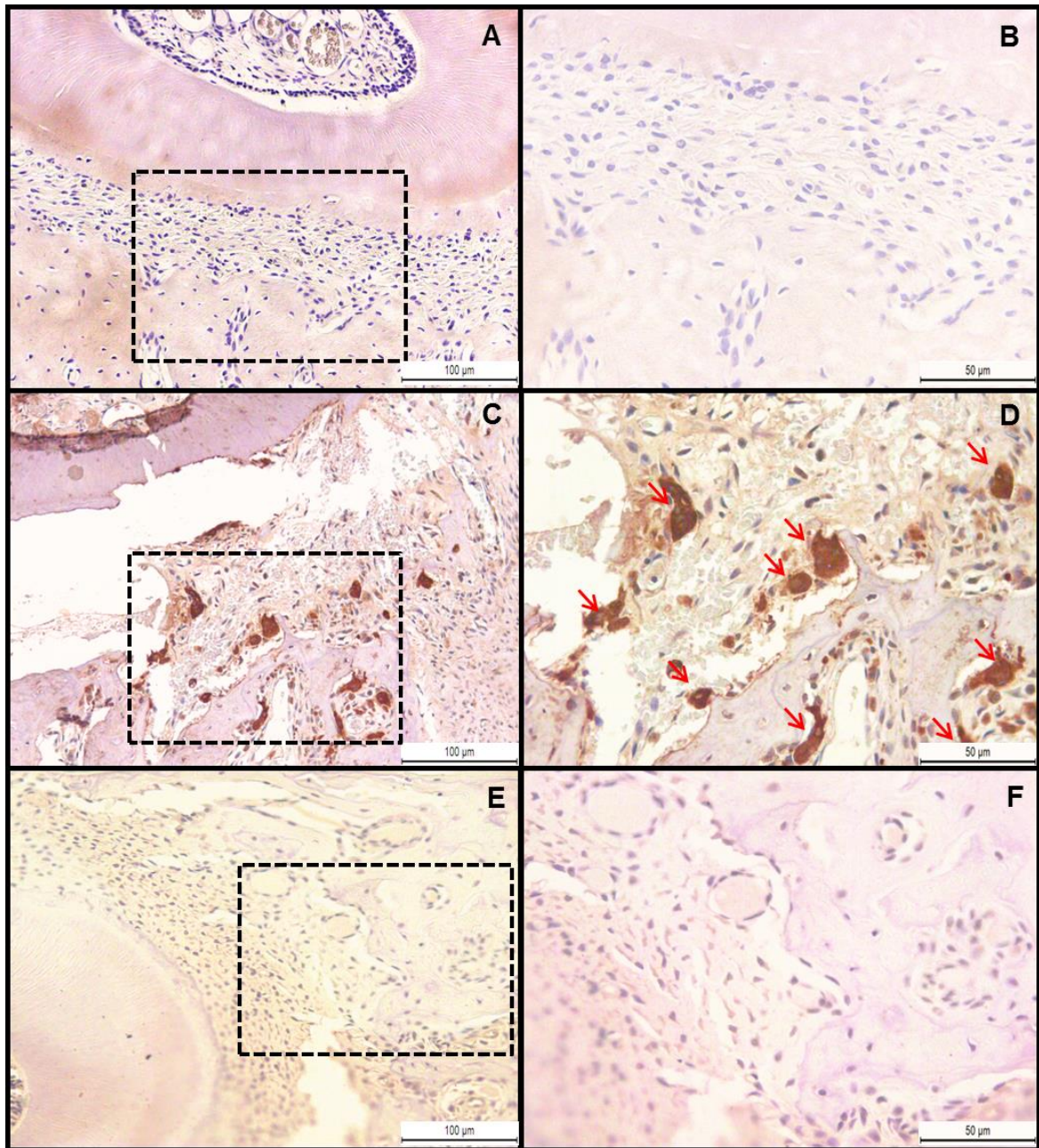


Figura 32. Efeito de ATV+ALD sobre a marcação imunohistoquímica de RANKL após 11 dias de MDI. (A, B) Raiz DV de hemiarcada normal, não submetidas à MDI; Raízes DV de hemiarcadas submetidas à MDI recebendo apenas água destilada (C, D – H₂O_d; 2 ml/kg), (E, F) ALD + ATV. Após 11 dias de MDI, os animais foram eutanasiados. As setas vermelhas demonstram marcação imunohistoquímica, (A, C, E) aumento de 200x; (B, D, F) aumento de 400x, cujas barras indicam 100 μm e 50 μm, respectivamente.

5.2.7 Dosagem sérica de fosfatase alcalina óssea

Quanto à quantificação da fosfatase alcalina óssea (FAO), observa-se na figura 33 (A) que a MDI em animais recebendo apenas H₂O_d. por 11 dias promoveu uma redução da FAO., As doses de 3 e 9 mg/kg de ATV promoveram um aumento significativo em comparação com o grupo H₂O_d. Em relação aos efeitos do alendronato (figura 33 B), observou-se que a dose de 1 mg/kg aumentou de forma significativa a concentração de FAO, em relação ao grupo H₂O_d, e a maior dose, 7 mg/kg de ALD, foi capaz de reverter a concentração sérica desta isoforma promovida pela MDI, de forma semelhante aos níveis basais (normal). A figura 33 (C) mostra o efeito da combinação das doses de 1 mg/kg de ATV e ALD, e constatou-se que a combinação desses fármacos promoveu um aumento da concentração de FAO, quando comparado ao grupo que recebeu apenas H₂O_d, embora não sinergicamente.

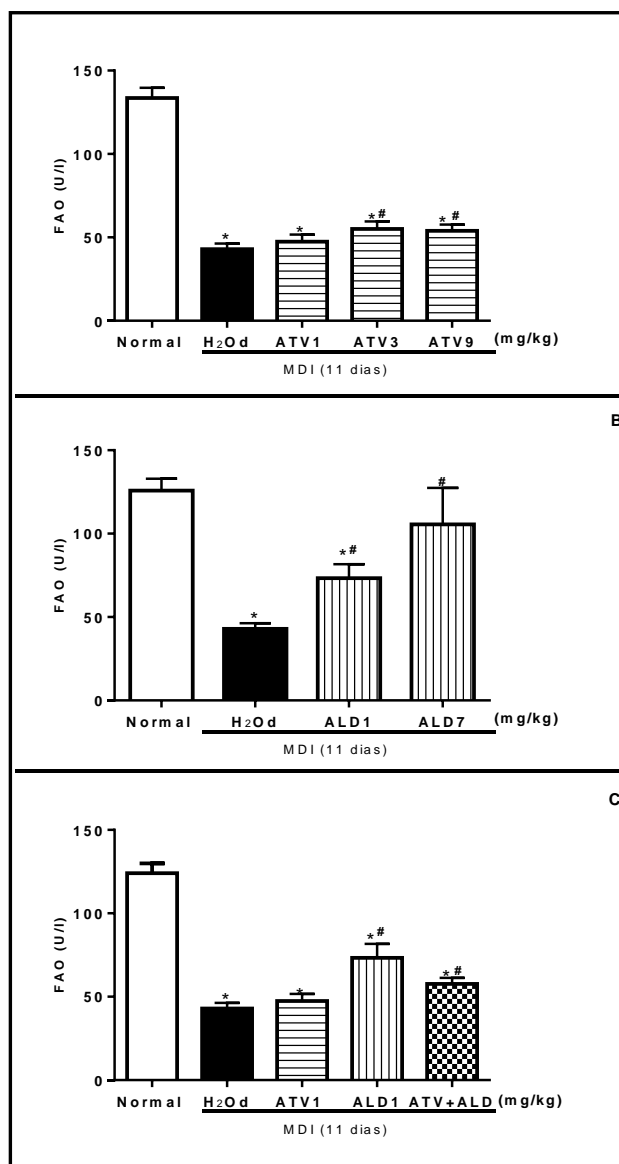


Figura 33. Dosagens séricas de fosfatases alcalinas ósseas de animais submetidos à MDI. (A) Fosfatase alcalina óssea (FAO) no início (normal) e na eutanásia dos animais submetidos à MDI e que receberam H₂O_d ou ATV (1, 3 e 9 mg/kg); (B) Fosfatase alcalina óssea (FAO) no início (normal) e na eutanásia dos animais submetidos à MDI e que receberam H₂O_d ou ALD (1 e 7 mg/kg); (C) Fosfatase alcalina óssea (FAO) no início (normal) e na eutanásia dos animais submetidos à MDI e que receberam H₂O_d, ou ATV e ALD em menores doses e sua combinação. (Anova e teste de Bonferroni). *p<0,05 em relação ao Normal; #p<0,05 em relação ao H₂O_d.

6 DISCUSSÃO

A movimentação dentária induzida (MDI) em animais tem demonstrado ser um modelo extremamente interessante sob o ponto de vista de estudo do metabolismo ósseo, uma vez que combina ambos os fenômenos biológicos que ocorrem durante o curso da movimentação, reabsorção e neoformação ósseas, não obstante o quão abordagens farmacológicas, tais como atorvastatina e alendronato, podem modular estes processos.

Os diversos efeitos destes fármacos têm sido descritos na literatura, porém ainda existem alguns questionamentos sobre suas atividades anti-inflamatória e antirreabsortiva na remodelação óssea alveolar. Este trabalho evidenciou que ambos os fármacos utilizados como monoterapias ou combinados entre si foram capazes de interferir na movimentação dentária induzida em ratos. Ainda, ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a investigar se a combinação de um hipolipemiante e de um antirreabsortivo ósseo favorece uma interação medicamentosa benéfica na MDI via modulação da resposta inflamatória dos animais.

A movimentação dentária promovida pela aplicação de uma força ortodôntica conduz a uma remodelação do ligamento periodontal e do osso alveolar. Tal movimentação ocorre de forma contínua e equilibrada, e é caracterizada por reabsorção e deposição ósseas em locais de compressão e tração, respectivamente. O processo se inicia com as alterações do fluxo sanguíneo e do ambiente eletroquímico, gerando e propagando cascatas de sinalização e consequente remodelação dos tecidos periodontais. Vários mediadores químicos da inflamação, como as citocinas, os fatores de crescimento, os neurotransmissores e as prostaglandinas, participam dos fenômenos biológicos inerentes à movimentação dentária. Estes compreendem os processos de inflamação, modificações morfológicas do ligamento periodontal, respostas vasculares e neurais, e o remodelação óssea propriamente dita (D'APUZZO et al., 2013; BROOKS *et al.*, 2009; KRISHNAN; DAVIDOVICH, 2006).

Neste estudo, o modelo de movimentação dentária induzida por mola fechada de níquel-titânio (Ni-Ti) em roedores foi escolhido devido à vantagem de se estudar ambos os processos inerentes à remodelação óssea, reabsorção e

neoformação (MOHRI; HANADA; OZAWA, 1991). A preferência pelo rato se deveu sobretudo à facilidade de se mensurar diretamente o deslocamento relativo à MDI, visto esse ter sido um dos parâmetros considerados de maior acurácia quando comparada à MDI humana. Assim sendo, preliminarmente, a MDI foi avaliada ao longo de 0, 1/4 (6ª hora), 1, 4, 7, 11, 14 e 21 dias. Para as medidas de deslocamento dentário foram consideradas as distâncias entre molares e incisivos superiores antes da instalação da mola e nos dias de eutanásia anteriormente citados. Observou-se que a instalação da mola, quando comparada aos valores de hemiarcadas contralaterais normais, promoveu um deslocamento dentário significativo, isto é, reduziu o espaço entre incisivos e molares superiores ao longo do curso de 21 dias. Dada à redução da distância entre os mesmos dentes contralaterais, sugerindo um deslocamento do molar no sentido mesial, e dos incisivos para o sentido palatino, o cálculo final de MDI foi definido como as diferenças das distâncias entre molares esquerdo e incisivos superiores antes da instalação da mola e novamente no momento da eutanásia, obtendo-se um valor do deslocamento dos molares e incisivos. Entretanto, a fim de determinar apenas a movimentação dos molares, essas medidas foram subtraídas daquelas da hemiarcada direita, visto que esta contralateral, também apresentaria uma redução da distância, pelo deslocamento palatino dos incisivos. Por fim, foi obtido o valor percentual, através da razão entre os dados encontrados e a distância inicial entre molares e incisivos da hemiarcada direita. Nesse estudo, portanto, a movimentação dos incisivos superiores foi descontada ao se utilizar esse formato de avaliação, fato esse desconsiderado nas avaliações dos diversos estudos de MDI em animais descritos na literatura.

Quanto à evolução temporal do processo de MDI, nossos achados podem ser corroborados por outros autores, os quais têm demonstrado que a instalação de uma mola de Ni-Ti, sob 40 gf, durante 7 dias, promoveu uma redução significativa da distância entre incisivos e molares esquerdos (MARQUEZAN; BOLOGNESE; ARAÚJO, 2010). Ainda, no estudo de Tan *et al.* (2009), observou-se que a instalação de uma mola fechada sob 20 gf, atingiu um pico de movimentação a partir do 10º dia. Ao se quantificar a distância entre incisivos e molares após a movimentação dentária induzida por 60 gf, Choi *et al.* (2010) constataram que a partir do 12º dia houve um aumento significativo da taxa de deslocamento dentário.

Apesar de diversos estudos evidenciarem que a aplicação de forças subtraumáticas é capaz de induzirem uma movimentação dentária sem afetar, de forma relevante, os processos de remodelação óssea alveolar, observa-se que não existe um consenso na literatura quanto às intensidades de forças consideradas ideais empregadas na ativação do dispositivo ortodôntico. A esse respeito, tem-se observado que uma movimentação dentária pode ser induzida desde 10 gf até 100 gf (WANG *et al.*, 2014; SODAGAR *et al.*, 2013; DUAN *et al.*, 2012). De fato, tem sido demonstrado que 10 e 50 gf podem promover uma maior taxa de movimentação dentária, enquanto a aplicação de forças excessivas pode promover decréscimo na quantificação deste processo (NAKANO *et al.*, 2014) ou, no mínimo, não aumentar a resposta biológica, nem os níveis de citocinas e quimiocinas e, portanto, não aumentar a taxa de movimentação dentária (ALIKHANI *et al.*, 2015). Vale salientar que 7 e 10 dias de MDI por 50 gf têm favorecido maiores imunomarcações para RANKL, RANK e M-CSF em odontoclastos, enquanto 10 gf não induziram tais imunomarcações (NAKANO *et al.*, 2011). Dessa maneira, pareceu-nos razoável a utilização de 50 gf neste estudo, visto que sua ação ir além de remodelação óssea, podendo interferir nas reabsorções radiculares também.

Tem sido demonstrado que as taxas de movimentação dentária em seres humanos seguem um curso temporal, no qual se distinguem três fases. Segundo Burstone (1962), a fase inicial, observada até 5 dias de duração, caracteriza-se por um movimento rápido dos dentes após a aplicação da força, sendo a movimentação atribuída apenas ao deslocamento do dente no espaço periodontal. A segunda fase, a de latência, envolve uma demora nos movimentos, uma vez que ocorrem baixas taxas de deslocamento dentário devido à hialinização do ligamento periodontal nas áreas de pressão. Essa fase se dá por volta do 6º até o 12º dia. Na terceira fase, denominada de fase de pós-latência, a taxa de movimentação dentária aumenta gradualmente, e se estabelece como tal a partir do 13º dia (KRISHNAN; DAVIDOVICH, 2006). De maneira interessante, essas fases de MDI, além de serem muito bem reconhecidas em humanos, seguem um curso temporal igualmente percebido nesse modelo animal em ratos. Em consonância a estas definições, no presente estudo, a fase inicial foi avaliada desde a 6ª hora, seguindo-se pelo 1º e 4º dias. Ainda de forma semelhante, nossos resultados evidenciaram que a fase de latência que se estendeu até o 7º dia, e a partir do 11º dia, houve, de fato, uma maior taxa de movimentação dentária induzida, indicando a fase de pós-latência.

Sanstedt (1904), Oppenheim (1911) e Schwarz (1932), em seus respectivos clássicos estudos histológicos, sugeriram a hipótese de que a movimentação dentária no osso alveolar de humanos decorria inicialmente do aparecimento de zonas de compressão e tração do ligamento periodontal. No lado de compressão, o ligamento periodontal apresentava uma desorganização e uma redução na produção de fibras, além de uma menor quantidade de células devido à constrição vascular, o que causaria uma reabsorção óssea. No lado de tração, havia um maior número de células e uma tração das fibras do ligamento periodontal, promovendo a deposição óssea. Assim, o ligamento periodontal possui um papel importante no processo de movimentação dentária. No presente estudo, os aspectos histológicos resultantes da aplicação de 50 gf na primeira fase da MDI, isto é, na 6ª h e nos dias 1 e 4, evidenciaram as áreas de compressão e de tração, além de hialinização no ligamento periodontal. Como esperado no 7º dia, observou-se que as áreas de compressão e de tração do ligamento periodontal retornaram às dimensões originais, inclusive com redução das áreas hialinas, sugerindo-se o início do processo de remodelação óssea/ reabsorção radicular, condizentes com as fases de latência e pós-latência, respectivamente.

Sabe-se que a hipóxia gerada pela constrição do ligamento periodontal no evento inflamatório inicial produz áreas de necrose focal, caracterizadas histologicamente por hialinização. Os sítios necróticos liberam várias substâncias quimioatraentes que induzem a migração de células gigantes multinucleadas, osteoclastos e macrófagos para a periferia do ligamento periodontal, promovendo uma reabsorção do tecido necrótico. Este processo leva a uma demora na movimentação dentária e, após o tecido ser reabsorvido, ocorre a progressão da remodelação óssea, promovendo a movimentação (KRISHNAN; DAVIDOVICH, 2006).

Tem sido demonstrado que os fenômenos biológicos que mais apresentaram variações entre os períodos de observação de 3, 5, 7 e 9 dias foram os relacionados às formações de áreas hialinas e às reabsorções radiculares (FRACALOSSO *et al.*, 2009). Particularmente, as áreas hialinas tiveram sua expressão máxima em 5 dias, enquanto as reabsorções radiculares mostraram-se mais intensas no período de 9 dias. Em ambos os fenômenos, as raízes mais afetadas foram as distais, em especial a raiz disto-vestibular (FRACALOSSO *et al.*, 2009), o que corrobora com os nossos resultados acima explicitados. Vale

ressaltar, que apesar da presença notável de áreas hialinas nas fases iniciais da movimentação dentária, estas podem ser observadas de maneira discreta em períodos tardios de movimentação (VON BOHL *et al.*, 2004), o que de fato observamos e, sim, de maneira muito escassa.

Sabe-se que a fase inicial da movimentação dentária induzida é caracterizada por uma resposta inflamatória aguda, com alteração na microvasculatura, e consequente migração de leucócitos, como neutrófilos, e outras células inflamatórias para a área desafiada (NIKLAS *et al.*, 2013; ZAINAL-ARIFFIN *et al.*, 2011). O neutrófilo consiste em um dos leucócitos mais abundantes no sulco e epitélio gengival, possuindo um papel-chave na proteção dos tecidos periodontais. Ainda, sabe-se que esta célula desempenha funções importantes, como destruição de agentes patogênicos e cicatrização tecidual, através de sua degranulação e liberação de várias enzimas, como a mieloperoxidase (MPO) (MENG *et al.*, 2007; SHENKEIN, 2006; RYDER, 2010; DEAS; MACKKEY; MCDONNEL, 2003). Esta tem sido relacionada a diversas células, porém, de forma abundante no neutrófilo. Assim, a análise de sua atividade tem sido utilizada para estimar o número de grânulos de polimorfonucleares nos tecidos (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982; LAU *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2005;)

Neste estudo observou-se que 6 horas de instalação da mola de Ni-Ti causou um aumento significativo da atividade de MPO no tecido gengival subjacente às áreas submetidas à MDI, com redução significativa a partir do 4º dia. Corroborando nossos achados, Marcaccini *et al.* (2010) demonstraram um aumento da atividade desta enzima em saliva e fluido crevicular gengival de pacientes após 2 horas de ativação do dispositivo, retornando aos níveis de normalidade aos 7 dias.

Estudos em animais podem ser úteis na investigação dos fenômenos biológicos da movimentação dentária induzida, além de possibilitar a análise dos mecanismos envolvidos na modulação do curso deste processo. Na literatura, existem diversos ensaios experimentais sobre como doenças sistêmicas (MAIA *et al.*, 2014), citocinas (HAKAMI *et al.*, 2015), laserterapia (FRAZEN *et al.*, 2015) e fármacos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014) podem acelerar ou limitar a movimentação dentária.

Considerando em conjunto os resultados até então, onde a MDI por mola de Ni-Ti em ratos, bem como os eventos histológicos, seguiram um curso temporal

semelhante ao observado à MDI humana, decidiu-se por realizar a avaliação dos efeitos das diferentes abordagens farmacológicas na movimentação dentária durante 11 dias, visto que esse período correspondeu ao início da fase de pós-latência, com todas as características de MDI propriamente dita ou seja, início de franco deslocamento dentário, raízes recentralizadas no ligamento periodontal, e maiores reabsorções óssea e radicular.

Sabe-se que durante o tratamento ortodôntico, abordagens farmacológicas podem ser utilizadas para o manejo da dor e da disfunção temporomandibular, e para resolução de alguma infecção durante o curso do tratamento. Além destes fármacos, os pacientes cada vez mais têm consumido suplementos vitamínicos, minerais ou hormonais, dentre outros compostos, para a prevenção ou tratamento de várias doenças sistêmicas, os quais podem influenciar os resultados do tratamento ortodôntico em curto e em longo prazo. Nesse contexto, conhecer é extremamente importante o conhecimento de mecanismos de ação dos fármacos e seus efeitos sobre a remodelação de tecidos ósseos inerente à movimentação ortodôntica (DIRAVIDAMANI; SIVALINGAM, AGARWAL, 2012). De fato, estudos em ratos têm demonstrado que bisfosfonatos, como alendronato de sódio, anti-inflamatórios não-esteroidais, como diclofenaco, rofecoxibe, ácido acetil salicílico, dentre outros, reduzem a movimentação dentária induzida, enquanto analgésicos com fraca atividade anti-inflamatória, como paracetamol, não afetam o processo de movimentação (DE CARLOS *et al.*, 2006; DE CARLOS *et al.*, 2007; ARIAS; MARQUEZ-OROZCO, 2006; STABILE *et al.*, 2009; KARRAS *et al.*, 2009). Apesar de muitos fármacos terem seus efeitos reconhecidos e previsíveis em ortodontia, alguns fármacos não o são, pelo menos, não completamente. Dentre estes, destacam-se os hipolipemiantes, como as estatinas sinvastatina e atorvastatina (HAN *et al.*, 2010; MIRHASHEMI *et al.*, 2013).

Assim, neste estudo, optou-se por avaliar os efeitos da monoterapia com atorvastatina e, oportunamente, combinada ao alendronato de sódio, na movimentação dentária induzida por 11 dias, considerando que ambos se utilizam da via do mevalonato para alguns de seus efeitos farmacológicos.

A literatura tem relatado que a atorvastatina, além ser um fármaco importante nos tratamentos da hipercolesterolemia e doenças cardiovasculares, também pode modular processos inflamatórios e perda óssea alveolar (ESTANISLAU *et al.*, 2015; GOES *et al.*, 2014). Ainda, os bisfosfonatos, como o

alendronato, são considerados fármacos antirreabsortivos potentes, e também podem interferir na remodelação óssea alveolar (BALLANTYNE, 2015; AGUIRRE *et al.*, 2010; GOES *et al.*, 2012).

O intuito de se verificar uma possível vantagem da combinação de ambos os fármacos se deve ao fato de que uma grande maioria de pacientes com condições necessárias de uso de alendronato, como a osteoporose, pode coincidir com uso de estatinas, utilizadas para a terapia de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose. Ainda, sabe-se que a aterosclerose e a osteoporose possuem patogênese similar, a qual envolve a deficiência estrogênica, calcificação. Comprometimento do estresse oxidativo e participação de citocinas inflamatórias, como IL-6 (WATTS, 2002). Desse modo, parece plausível a possibilidade de uma potencialização do efeito antirreabsortivo de ambos, visto que a atorvastatina e o alendronato atuam na redução da reabsorção óssea através da inibição da farnesil pirofosfato sintetase (FISHER *et al.*, 1999) e da HMG-CoA redutase (HALCOX; DEANFIELD; 2004), respectivamente, as quais são enzimas importantes na via do mevalonato. Através desta inibição, há uma redução da prenilação de proteínas responsáveis pela manutenção estrutural dos osteoclastos.

No presente estudo, observou-se que a administração de atorvastatina por 28 dias reduziu a MDI macroscopicamente, visto que houve uma diminuição do deslocamento dos molares no sentido mesial. A dose de 9 mg/kg de ATV foi capaz de anular o processo de movimentação. Corroborando nossos achados, MirHashemi *et al.* (2013) demonstraram que a instalação de uma mola de níquel-titânio, com 60 gf durante 21 dias, aumentou a movimentação dentária caracterizada pelo aumento da distância entre 1º e 2º molares superiores esquerdos. Adicionalmente, a administração diária de 5 mg/kg de atorvastatina reduziu esta movimentação. Ainda, Han *et al.* (2010) autores concluíram que 2,5 mg/kg-vo de sinvastatina durante 4 semanas promoveu maior retenção dentária, reduzindo a recidiva da movimentação.

Quanto aos bisfosfonatos, estudos mostram que essa classe de fármacos, a qual incluem alendronato, ácido zoledrônico, dentre outros, são capazes de inibir a movimentação dentária induzida por mola de forma dose independente. Nossos resultados mostraram que o alendronato, em doses semanais consideradas alta ou baixa, de 7 e 1 mg/kg, respectivamente, durante 28 dias, restringiu significativamente a movimentação dentária, ao impedir o deslocamento dos molares

no sentido mesial. Corroborando nossos dados, os estudos de Karras *et al.* (2009) e os de Kaipatur *et al.* (2013) mostraram que o alendronato, tanto em doses altas de 7 mg/kg (v.o; dose semanal; 28 dias), como em baixas de 0,015 mg/kg (s.c; 2 vezes por semana; 56 dias) reduziu significativamente o diastema entre 1º e 2º molares obtido pela instalação de uma mola fechada de níquel titânio em ratos durante 21 e 28 dias, respectivamente. Ainda, Sirisoontorn *et al.* (2012) demonstraram que a administração de 1,6 µg/kg de ácido zoledrônico, por via intraperitoneal durante 6 semanas, preveniu a movimentação dentária induzida previamente por 25 gf em ratas ovariectomizadas, bem como a reabsorção radicular.

Ao combinar as menores doses de atorvastatina e alendronato também se observou uma redução da movimentação dentária induzida, a qual foi mais significativa em comparação às mesmas doses isoladamente. A atividade desta combinação em modelo de reabsorção óssea alveolar foi investigada por nosso laboratório (GOES *et al.*, 2014), em que subdosagens (0,01 ou 0,25 mg/kg, s.c.) de alendronato e atorvastatina na dose de 27 mg/kg administradas profilática e terapêuticamente promoveram uma redução da destruição óssea.

Assim como no modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura participam diversos mediadores da inflamação, os quais caracterizam uma resposta inflamatória capaz de evocar eventos reabsortivos ósseos alveolares, a movimentação dentária induzida é distinguida por eventos inflamatórios, desde as alterações vasculares e celulares, até o aparecimento de mediadores químicos, originando a remodelação óssea, caracterizada por ambos os processos de reabsorção e formação ósseas (ANDRADE JR; TADDEI; SOUZA, 2012). Neste estudo, observou-se que a atorvastatina, o alendronato e a combinação de ambos por 28 dias não preveniram as áreas de compressão e tração do ligamento periodontal vistas na MDI. Esses resultados estão de acordo com os do estudo de MirHashemi *et al.* (2013), em que a atorvastatina não interferiu na extensão do ligamento periodontal nos níveis coronal e apical. Entretanto, os resultados demonstraram que ambas as terapias, mono ou combinação de fármacos, foram capazes de prevenir a formação de áreas hialinas, visto que a atorvastatina nas 3 doses utilizadas, alendronato na maior dose de 7 mg/kg e a combinação das menores doses (1 mg/kg cada) reduziram esta área no ligamento periodontal promoveram maiores preservações óssea e radicular, possivelmente decorrente de seus efeitos inibitórios da resposta inflamatória na movimentação dentária induzida.

Nesse estudo, observou-se claramente que a atorvastatina e/ou alendronato são fármacos que reduziram a MDI, tanto no seu aspecto macroscópico, impedindo o deslocamento dentário, como nos seus aspectos histomorfométricos, restringindo a hialinização necessária ao desencadeamento da remodelação óssea alveolar, o que minimizaria danos radiculares. Assim, o passo seguinte considerou verificar se a modulação da resposta inflamatória poderia estar contribuindo para os eventos antirreabsortivos ósseos demonstrados pelos fármacos utilizados, quanto aos eventos inflamatórios, os quais se caracterizam pela presença de células inflamatórias, como neutrófilos, além da liberação de alguns mediadores inflamatórios, como citocinas (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006; ANDRADE JR; TADDEI; SOUZA, 2012) pró-inflamatórias.

Neste estudo verificou-se que apenas a maior dose de atorvastatina foi capaz de reduzir a atividade de mieloperoxidase. A modulação de neutrófilos pela atorvastatina já foi demonstrada na literatura. No modelo de periodontite experimental, Araújo-Júnior *et al.* (2013) demonstraram que a atorvastatina na dose de 10 mg/kg foi capaz de reduzir a concentração de MPO no tecido gengival de animais submetidos à periodontite experimental. Barsante *et al.* (2005) também demonstraram os efeitos benéficos de atorvastatina na dose de 10 mg/kg nos níveis de MPO em um modelo de indução de artrite experimental.

Assim como no modelo de periodontite em ratos, onde a permanência da ligadura favorece o acúmulo microbiano (BEZERRA *et al.*, 2000), e consequentemente impede a resolução do processo, a ativação da mola de Ni-Ti favorece a exacerbação da resposta inicial, antes sobretudo caracterizada pela abundância de neutrófilos, desta feita, também pelo surgimento de mediadores como citocinas. Dentre elas, destaca-se a interleucina-1 β , a qual sabe-se estar presente desde os estágios iniciais da movimentação dentária e está envolvida na sobrevivência, fusão e ativação de osteoclastos. Quando avaliamos os níveis de IL-1 β nos tecidos gengivais subjacentes às molas durante 11 dias de MDI, observou-se um aumento significativo da quantificação desta citocina, quando comparado aos tecidos gengivais não desafiados, ao que se sugere que esta citocina desempenha um papel importante na remodelação óssea do processo alveolar, o qual está correlacionado com a quantificação da movimentação dentária (BLETSA; BERGGREEN; BRUDVIK, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2010). De fato, relatos na literatura mostraram que a movimentação dentária induzida pela aplicação de 50 gf durante

10 dias aumentou os níveis de IL-1 β gengival (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014), o que corrobora os nossos achados.

Em nosso estudo, observou-se que a administração atorvastatina na maior dose, alendronato 1 mg/kg e a combinação das menores doses de ambos os fármaco reduziram os níveis de IL-1 β . Em consonância aos nossos resultados, outros autores também verificaram que a ATV reduziu os níveis de IL-1 β concomitantemente à redução da inflamação vista na periodontite experimental ou na pata de animais com artrite (ARAÚJO-JÚNIOR *et al.*, 2013; BARSANTE *et al.*, 2005).

Sobre os resultados inibitórios do alendronato sobre os níveis de IL-1 β , não há estudos considerando protocolos semelhantes ao desse estudo, além de que ainda há controvérsias sobre os efeitos dose/concentração dependentes de alendronato na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β : Shikama *et al.* (2010) demonstraram que 3 dias de administrações consecutivas intraperitoneais (40 μ mol/kg) de alendronato aumentou a produção de IL-1 β por macrófagos, e Deng *et al.* (2009) observaram que o alendronato (10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M) também aumentou a liberação de IL-1 β induzida por bactérias periodontogênicas através da ativação da caspase-1, e sugeriram a associação deste mecanismo e o desenvolvimento de osteomielite da mandíbula. Por outro lado, Shirai *et al.* (2011) observaram que o alendronato (0,14 mg/kg – s.c.) reduziu o dano articular, concomitantemente a uma diminuição na imunomarcção para IL-1 β , RANKL e MMP-13.

O aumento de IL-1 β e outras citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-17 podem estimular a osteoclastogênese pelo aumento da expressão de RANKL e redução da produção de OPG em osteoblastos e células estromais (NAKASHIMA *et al.*, 2000; NUKAGA *et al.*, 2004). Esses marcadores são os principais reguladores da resposta óssea, e desempenham uma função importante na homeostasia do tecido ósseo (WALSH *et al.*, 2006). Estudos têm demonstrado um aumento da concentração de RANKL e redução dos níveis de OPG, conseqüentemente aumentando a razão entre RANKL/OPG nos tecidos periodontais (TYROVOLA *et al.*, 2008), incluindo o fluido crevicular gengival (GRANT *et al.*, 2013), além da saliva (FLÓREZ-MORENO; ISAZA-GUZMAN; TOBON-ARROYAVE, 2013) durante a movimentação dentária induzida. Tem sido mostrado que o RANKL é expresso em fibroblastos e osteoblastos no lado de compressão do ligamento periodontal, e a diferenciação de osteoclastos é influenciada por RANKL, o qual é produzido como um fator local em

resposta ao estresse mecânico (TYROVOLA *et al.*, 2008). Têm sido demonstrado que o RANKL ativa a osteoclastogênese no tecido periodontal, e conseqüentemente, aumenta significativamente a taxa de movimentação dentária ortodôntica (KANZAKI *et al.*, 2006) e a reabsorção óssea no lado de compressão durante a movimentação ortodôntica (YOKOYA; SASAKI; SHIBASA, 1997; SASAKI, 2003). A expressão de RANKL pode ser correlacionada o aumento da imunomarcção para osteoclastos, os quais são células multinucleadas e TRAP-positivas (LUBBERTS *et al.*, 2002). No processo de regulação da remodelação óssea também há a participação da OPG. Esta molécula ao se ligar ao RANKL impede a sua interação com o receptor, e pode ser encontrada em níveis aumentados no lado de tração do ligamento periodontal (TAN *et al.*, 2009), inibindo a remodelação óssea mediada pela movimentação ortodôntica, e estimulando a formação óssea (LOSSFORFER *et al.*, 2002). Além da participação deste eixo na remodelação óssea, tem sido sugerido que o aumento de RANKL e redução de OPG também contribuem para a reabsorção radicular durante a movimentação ortodôntica (NISHIJIMA *et al.*, 2006). A reabsorção radicular resulta da atividade dos odontoclastos, a qual desempenha um papel similar aos osteoclastos na reabsorção óssea, entretanto possuem um núcleo menor, uma menor área TRAP positiva e maior expressão de MMP-9 (TSUCHIYA *et al.*, 2008).

A literatura tem demonstrado que estatinas, como sinvastatina e atorvastatina, podem interferir na progressão dos eventos de reabsorção e formação óssea na movimentação dentária. Na periodontite experimental as estatinas reduziram a imunomarcção para RANKL e aumentaram a expressão de OPG nos tecidos periodontais (HAN *et al.*, 2010; ARAÚJO JÚNIOR *et al.*, 2013). Em relação ao alendronato, de Almeida *et al.* (2015) demonstraram na periodontite experimental que ratos submetidos à combinação de raspagem e irrigação com alendronato (10^{-5} M) reduziram a imunomarcção para RANKL e TRAP e aumentaram a expressão de OPG. No presente estudo, demonstrou-se que as administrações de atorvastatina, alendronato e sua combinação reduziram a imunomarcção de RANKL E TRAP, bem como um aumento da marcação para OPG, sugerindo que a modulação da resposta inflamatória, desde os eventos iniciais, como redução da atividade neutrofílica e presença de IL-1 β , pode ter contribuído para a restrição da remodelação óssea da MDI. De fato, quando relembramos que a menor dose de ATV, a qual não foi capaz de reduzir a atividade de MPO, bem como os níveis de IL-1 β , entretanto foi capaz de reduzir as imunomarcações relacionadas à

osteoclastogênese (RANKL e TRAP) ou aumentar a relacionada à osteoblastogênese (OPG).

Complementando, verificamos que a 11 dias MDI reduziram, de forma significativa, os níveis séricos de fosfatase alcalina óssea. A fosfatase alcalina óssea consiste em um indicador importante para a formação óssea (MOHAMADNIA *et al.*, 2009). Tem sido observado que a ativação ortodôntica em pacientes por até quatro semanas promoveu uma redução dos níveis de fosfatase alcalina no fluido crevicular gengival (ASMA; ROHAYA; HISHAM, 2008).

Nesse estudo, a administração das três doses de atorvastatina, alendronato 1 mg/kg e a combinação das menores doses desses fármacos não preveniram o decréscimo de FAO em relação ao grupo Normal (valores basais), porém, estes subgrupos de fármacos aumentaram o nível desta enzima, quando comparados a H₂O_d (MDI), e mais ainda, o alendronato na dose de 7 mg/kg, preveniu significativamente a redução desta isoforma. Quanto ao alendronato, nossos dados estão de acordo com dados de nosso laboratório, onde observamos que o ALD na dose de 0,25 mg/kg preveniu a redução da fosfatase alcalina óssea vista em 11 dias de periodontite em ratos (GOES *et al.*, 2012).

Apesar de não haver um consenso na literatura a cerca do real papel particularmente da ATV sob esta isoforma óssea, visto que Majima *et al.* (2007), estudando 22 pacientes sob uso de ATV 10 mg/kg por 3 meses, não observaram uma alteração significativa na fosfatase alcalina óssea, nossos resultados, em conjunto, sugerem que ambos os fármacos, resguardando as devidas proporções, evocaram um perfil anabólico ósseo plausível nesse modelo de MDI. Obviamente que alguns mecanismos intrínsecos da ATV sobre os níveis de FAO não estão completamente elucidados, contudo, corroborando nossos achados, alguns autores têm apontado para um papel anabólico ósseo dessa estatina. Farag, Mohamed, Youssef (2015) demonstraram que o pré-tratamento com ATV nas doses de 5 e 10 mg/kg, por 21 dias, aumentaram significativamente os níveis de fosfatase alcalina total. Du *et al.* (2011), ao investigarem a atividade da sinvastatina na osseointegração de implantes, observaram 5 mg/kg de ATV administrados diariamente por 28 dias, foram capazes de aumentar os níveis de fosfatase alcalina óssea, estimulando a neoformação ao redor dos implantes

Assim, observou-se que provavelmente a atorvastatina, o alendronato e sua combinação exerceram um efeito inibitório no processo de remodelação óssea da movimentação dentária induzida. Possivelmente, esse resultado foi relacionado aos efeitos anti-inflamatórios da atorvastatina, uma vez que os resultados sugeriram que este fármaco foi capaz de reduzir a atividade da enzima MPO, bem como os níveis de IL-1 β . O alendronato na menor dose e sua combinação com a atorvastatina de menor dose promoveu uma ação modulatória no processo inflamatório, provavelmente ao interferir nos níveis de IL-1 β . Nesse aspecto, a administração concomitante de ambos os fármacos mostrou-se vantajosa, visto que a administração isolada de atorvastatina na maior dose, não foi capaz de reduzir os níveis de IL-1 β . Por fim, nossos resultados sugerem um perfil anti-inflamatório da atorvastatina e o alendronato, que promoveram uma redução de marcadores relacionados à osteoclastogênese, como RANKL e TRAP, além de aumentar a imunomarcção para OPG e os níveis de fosfatase alcalina total e óssea, sugerindo um estímulo à formação óssea.

Em suma, de forma interessante, enquanto apenas as maiores doses de ATV, ALD ou combinações das menores doses ATV+ALD foram capazes de restringir de forma significativa a MDI, concomitantemente aos efeitos demonstrado em reduzir neutrófilos, IL-1 β e imunomarcção para osteoclastogênese, ao passo que somente dose elevada de ALD evidenciou potencial anabólico ósseo importante por aumentar os níveis séricos de FAO, não obstante a imunomarcção para OPG, sugere-se que a modulação da MDI devidas às abordagens farmacológicas nesse estudo se fez primariamente por redução da resposta inflamatória e secundariamente por anabolismo ósseo. Assim sendo, novos estudos são necessários para melhor distinguir os efeitos anti-inflamatórios e antirreabsortivos da atorvastatina e do alendronato através da inibição da via do mevalonato.

7 CONCLUSÃO

- O modelo de movimentação dentária induzida em ratos foi capaz de mimetizar as principais características da remodelação óssea vista em humanos.
- A atorvastatina e o alendronato interferiram na resposta inflamatória e no metabolismo ósseo dos animais, reduzindo atividade neutrofílica e citocinas inflamatórias e aumentando os eventos anabólicos ósseos.
- A combinação de baixas dosagens de ambos os fármacos não apresentou sinergismo na atividade anti-inflamatória, porém potencializou o efeito antirreabsortivo, inibindo a movimentação, sem alteração significativa da atividade anabólica óssea.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSEN, B.; PAZIANAS, M.; EIKEN, P.; RUSSEL, R. G.; EASTELL, R. Esophageal and gastric cancer incidence and mortality in alendronate users. **J Bone Miner Res**, v. 27, n. 3, pp. 679-687, mar. 2012.
- AGUIRRE, J. I.; ALTMAN, M. K.; VANEGAS, S. M.; FRANZ S. E.; BASSIT, A. C.; WRONSKI, T. J. Effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats. **Oral Dis**, v. 16, n. 7, pp. 674-685, oct. 2010.
- ALIKHANI, M.; RAPTIS, M.; ZOLDAN, B.; SANGSUWON, C.; LEE, Y. B.; ALYAMI, B.; CORPODIAN, C.; BARRERA, L. M.; ALANSARI, S.; KHOO, E.; TEIXEIRA, C. Effect of micro-osteoperforations on the rate of tooth movement. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 144, n. 5, pp. 639-648, nov. 2013.
- ALIKHANI, M.; ALYAMI, B.; LEE, I. S.; ALMOAMMAR, S.; VONGTHONGLEUR, T.; ALIKHANI, M.; ALANSARI, S.; SANGUWON, C.; CHOU, M. Y.; KHOO, E.; BOSKEY, A.; TEIXEIRA, C. C. Saturation on the biological response to orthodontic forces and its effect on the rate of tooth movement. **Orthod Craniofac Res**, v. 18, n. 1, pp. 8-17, apr. 2015.
- ALMEIDA, M.; HAN, L.; BELLIDO, T.; MANOLAGAS, S. C.; KOUSTENI, S. Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoclast progenitors and differentiated osteoblast by beta-catenin-dependent and independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. **J Biol Chem**, v. 280, n. 50, pp. 42343-41351, dec. 2005.
- ANDRADE JR, I.; TADDEI, S. R. A.; SOUZA, P. E. A. Inflammation and tooth movement: the role of cytokines, chemokines and growth factors. **Semin Orthod**, v. 18, n. 4, pp. 257-269, dec. 2012.
- ARAÚJO JÚNIOR, R. F.; SOUZA, T. O.; DE MOURA, L. M.; TORRES, K. P.; DE SOUZA L. B.; ALVES MDO, S.; ROCHA, H. O.; DE ARAÚJO, A. A. Atorvastatin decreases bone loss, inflammation and oxidative stress in experimental periodontitis. **Plos One**, v. 8, n. 10, pp. 1-7, oct. 2013.
- ARIAS, O. R.; MARQUEZ-OROZCO, M. C. Aspirin, acetaminophen, and ibuprofen: their effects on orthodontic tooth movement. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 130, n. 3, pp. 364-370, sep. 2006.
- ASMA, A. A. A.; ROHATA, M. A. W.; SHAHRUL-HISHAM, Z. A. Crevicular alkaline phosphatase activity during orthodontic tooth movement: canine retraction stage. **J Med Sci**, v. 8, n. 3, pp. 228-233, apr. 2008.
- BABA, S.; KURODA, N.; ARAI, C.; NAKAMURA, Y.; SATO, T. Immunocompetent cells and cytokine expression in the rat periodontal ligament at the initial stage of orthodontic tooth movement. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 5, pp. 466-473, may. 2011.

BALLANTYNE, E. Bisphosphonates: possible modes of action and implication for dental implant treatment. A review of the literature. **J Gen Pract**, v. 3, n. 1, pp. 1-28, feb. 2015.

BALLI, U.; KELES, G. C.; CETINKAYA, B. O.; MERCAN, U.; AYAS, B.; ERDOGAN, D.; BALLI, U.; KELES, G. C.; CETINKAYA, B. O.; MERCAN, U.; AYAS, B.; ERDOGAN, D. Assessment of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in the periodontium of rats treated with atorvastatin. **J Periodontol**, v. 85, n. 1, pp. 178-187, jan. 2014.

BARSANTE, M. M.; ROFFÊ, E. YOKORO, C. M.; TAFURI, W. L.; SOUZA, D. G.; PINHO, V.; CASTRO, M. S.; TEIXEIRA, M. M. Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. **Eur J Pharmacol**, v. 516, n. 3, pp. 282-289, jun. 2005.

BENER, A.; DOGAN, M.; BARAKAT, L.; AL-HAMAQ, A. O. Comparison of efficacy, safety, and cost-effectiveness of various statins in dyslipidemic diabetic patients. **Indian J Pharmacol**, v. 56, n. 1, pp. 88-93, jan/feb 2014.

BERGSTRON, J. D.; BOSTEDOR, R. G.; MASARACHIA, P. J.; RESZKA, A. A.; RODAN, G. Alendronate is a specific, nanomolar inhibitor of farnesyl diphosphate synthase. **Arch Biochem Biophys**, v. 373, n. 1, pp. 231-241, jan. 2000.

BLETSA, A.; BERGGREEN, E.; BRUDVIK, P. Interleukin-1alfa and tumor necrosis factor-alfa expression during the early phases on orthodontic tooth movement in rats. **Eur Journal Oral Sci**, v. 144, n. 5, pp. 423-429, oct. 2006.

BONE, H.; HOSKING, D.; DEVOGELAER, J. P.; TUCCI, J. R.; EMKEY, R. D.; TONINO, R. P.; RODRIGUEZ-PORTALES, J. A.; DOWNS, R. W.; GUPTA, J.; SANTORA, A. C.; LIBERMAN, U. A. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. **N Engl J Med**, v. 350, n. 12, pp. 1189-1199, mar. 2004.

BONE, H. G.; KIEL, D. P.; LINDSAY, R. S.; LEWIECKI, E. M.; BOLOGNESE, M. A.; LEARY, E. T.; LOWE, W.; MCCLUNG, M. R. Effects of atorvastatin on bone in postmenopausal women with dyslipidemia: a double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 12, pp. 4671-4677, dec. 2007.

BONEWALD, L. F.; JOHNSON, M. L. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. **Bone**, v. 42, n. 4, pp. 606-615, apr. 2008.

BOTTORF, M.; HANSTEN, P. Long-term safety of hepatic hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitors: the role of metabolism-monograph for physicians. **Arch Intern Med**, v. 160, n. 15, pp. 2273-2280, aug. 2000.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618-22, sep. 1982.

BRASIL. Presidência da República. Disponível em> http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm. Último acesso em: 23 nov 2015

- BRAUN, T.; ZWERINA, J. Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 13, n. 4, pp. 1-11, jul. 2011.
- BROOKS, P. J.; NILFOROUSHAN, D.; MANOLSON, M. F.; SIMMONS, C. A.; GONG, S. G. Molecular markers of early orthodontic tooth movement. **Angle Orthod**, v. 79, n. 6, pp. 1108-1113, nov. 2009.
- BROWN, J. P.; MORIN, S.; LESLIE, W.; PAPAIOANNOU, A.; CHEUNG, A. M.; DAVISON, K. S.; GOLTZMAN, D.; HANLEY, D. A.; HODSMAN, A.; JOSSE, R.; JOVAISAS, A.; JUBY, A.; KAISER, S.; KARAPLIS, A.; KENDLER, D.; KHAN, A.; NGUI, D.; OLSZYNSKI, W.; STE-MARIE, L.G.; ADACHI, J. Bisphosphonates for treatment of osteoporosis: expected benefits, potential harms and drug holidays. **Can Fam Physician**, v. 60, n. 4, pp. 324-333, apr. 2014.
- BRUGTS, J. J.; YETGIN, T.; HOEKS, S. E.; GOTTO, A. M.; SHEPHERD, J.; WESTENDORP, R. G.; DE CRAEN, A. J.; KNOPP, R. H.; NAKAMURA, H.; RIDKER, P.; VAN DOMBURG, R.; DECKERS, J. W. The benefits of statins in people without established cardiovascular disease but with cardiovascular risk factors: meta-analysis of randomised controlled trials. **BMJ**, v. 338, pp. 1-8, jun. 2009.
- BULTINK, I. E. Inflammatory rheumatic disorders and bone. **Curr Rheumatol Rep**, v. 14, n. 3, pp. 224-230, jun. 2012.
- BURSTONE, C. J. The biomechanics of tooth movement. In: KRAUS, B. S.; RIEDEL R. A. **Vistas in orthodontics**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1962. p. 197-204
- CARDWELL, C. R.; ABNET, C. C.; CANTWELL, M. M.; MURRAY, L. J. Exposure to oral bisphosphonates and risk of esophageal cancer. **JAMA**, v. 304, n. 6, pp. 657-663, aug. 2010.
- CHOI, J.; BAEK, S. H.; LEE, J. I.; CHANG, Y. I. Effects of clodronate on early alveolar bone remodeling and root related to orthodontic forces: A histomorphometric analysis. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 138, pp. 1-8, jan. 2010.
- CILLA, D. D.; WHITFIELD, L. R.; GIBSON, D. M.; SEDMAN, A. J.; POSVAR, E. L. Multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy subjects. **Clin Pharmacol Ther**, v. 60, n. 6, pp. 687-695, dec. 1996.
- COMPSTON, J. Pathophysiology of atypical femoral fractures and osteonecrosis of the jaw. **Osteoporos Int**, v. 22, n. 12, pp. 2951-2961, dec. 2011.
- COSTA-SCHARPLATZ, M.; RAMANATHAN, K.; FRIAL, T.; BEAMER, B.; GANDHI, S. Cost-effectiveness analysis of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin and pravastatin from a Canadian health system perspective. **Clin Ther**, v. 30, n. 7, pp. 1345-1357, jul. 2008.
- CREMERS, S. C.; PILLAI, G.; PAPAPOULOS, S. E. Pharmacokinetics/ pharmacodynamics of bisphosphonates: use for optimisation of intermittent therapy for osteoporosis. **Clin Pharmacokinetic**, v. 44, n. 6, pp. 551-570, 2005.

CUNHA, F. Q. BOUKILI, M. A.; MOTTA, J. I. B.; VARGAFTIG, B. B.; FERREIRA, S. H. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **Eur J Pharmacol** v. 238, n. 1, p. 47-52, jul. 1993

D'APUZZO, F.; CAPPABIANCA, S.; CIAVARELLA, D.; MONSURRÒ, A.; SILVESTRINI-BIAVATI, A.; PERILLO, L. Biomarkers of periodontal tissue remodeling during orthodontic tooth movement in mice and men: overview and clinical relevance. **Scientific World Journal**, 2013.

DATTA, H. K.; NG, W. F.; WALKER, J. A.; TUCK, S. P.; VARANASI, S. S. The cell biology of bone metabolism. **J Clin Pathol**, v. 61, n. 55, pp. 577-587, may. 2008.

DE ALMEIDA, J.; ERVOLINO, E.; BONFIETTI, L. H.; NOVAES, V. C.; THEODORO, L. H.; FERNANDES, L. A.; MARTINS, T. M.; FALEIROS, P. L.; GARGIA, V. G. Adjuvant Therapy with sodium alendronate for the treatment of experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v.86, n. 10, pp. 1166-1175, oct. 2015.

DE CARLOS, F.; COBO, J.; PERILLAN, C.; GARGIA, M. A.; ARGUELLES, J.; VIJANDE, M.; COSTALES, M. Orthodontic tooth movement after different coxib therapies. **Eur J Orthod**, v. 29, n. 6, pp. 596-599, dec. 2007.

DE CARLOS, F.; COBO, J.; DÍAZ-ESNAL, B.; ARGUELLES, J.; VIJANDE, M.; COSTALES, M. Orthodontic tooth movement after inhibition of ciclooxynase-2. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 129, n. 3, pp. 402-406, mar. 2006.

DE OLIVEIRA, E. L.; FREITAS, F. F.; DE MACEGO, C. G.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; SILVA, M. B.; MANHÃES-JR, L. R.; JUNQUEIRA, L. R.; NAPIMOGA, M. H. Low dose propranolol decreases orthodontic movement. **Arch Oral Biol**, v. 59, n. 10, pp. 1094-1100, oct. 2014.

DEAS, D. E.; MACKAY, S. A.; MCDONNELL, H. T. Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. **Periodontol 2000**, v. 32, pp. 82-104, 2003.

DECKERS, M. M.; KARPERIEN, M.; VAN DER BENT, C.; YAMASHITA, T.; PAPAPOULOS, S. E.; LOWIK, C. W. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. **Endocrinology**, v. 141, n. 5, pp. 1667-1674, may. 2000.

DENG, X.; TAMAI, R.; ENDO, Y.; KIYOURA, Y. Alendronate augments interleukin-1 β release from macrophages infected with periodontal pathogenic bacteria through activation of caspase-1. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 235, n. 1, pp. 97-104, feb. 2009.

DI DOMENICO, M.; D'APUZZO, F.; FEOLA, A.; CITO, L. MONSURRÒ, A.; PIERANTONI, G. M.; BERRINO, L.; DE ROSA, A.; POLIMENI, A.; PERILLO, L. Cytokines and VEGF induction in orthodontic movement in animal models. **J Biomed Biotechnol**, 2012.

DI GREGORIO, S.; DEL RIO, L.; RODRIGUEZ-TOLRA, J.; BONEL, E.; GARCIA, M.; WINZENRIETH, R. Comparison between different bone treatments on areal bone mineral density (aBMD) and bone microarchitectural texture as assessed by the trabecular bone score (TBS). **Bone**, v. 75, pp. 138-143, 2015.

DIRAVIDAMANI, K.; SIVALINGAM, S. K.; AGARWAI, V. Drugs influencing orthodontic tooth movement: An overall review. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 4, pp. 299-303, aug. 2012.

DOMINGUEZ, L. J.; DI BELLA, G.; BELVEDERE, M.; BARBAGALLO, M. Physiology of the aging bone and mechanisms of action of bisphosphonate. **Biogerontology**, v. 12, n. 5, pp. 397-407, oct. 2011.

DU, Z.; CHEN, J.; YAN, F.; XIAO, Y. Effects of simvastatin on bone healing around titanium implants in osteoporotic rats. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 2, pp. 145-150, feb. 2009.

DU, Z.; CHEN, J.; YAN, F.; DOAN, N.; IVANOVSKI, S.; XIAO, Y. Serum bone formation marker correlation with improved osseointegration in osteoporotic rats treated with simvastatin. **Clin Oral Implants Res**, v. 24, n. 4, pp. 422-427, apr. 2011.

DUAN, J.; NA, Y.; LIU, Y.; ZHANG, Y. Effects of the pulse frequency of low-level laser therapy on the tooth movement speed of rat molars. **Photomed Laser Surg**, v. 30, n. 11, pp. 663-667, nov. 2012.

DUNN, C. J.; GOA, K. L. Risedronate: a review of its pharmacological properties and clinical use in resorptive bone disease. **Drugs**, v. 61, n. 5, pp. 685-712, 2001.

DUTRA, C.S. **Efeito da dipirona sódica na remodelação óssea pela movimentação dentária induzida em ratos**. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará: Ceará, 2011.

ELLESAT, K. S.; TOLLEFSEN, K. E.; ASBERG, A.; THOMAS, K. V.; HYLLAND, K. Cytotoxicity of atorvastatin and simvastatin on primary rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Toxicol in Vitro**, v. 24, n. 6, pp. 1610-1628, sep. 2010.

ENDO, A.; TSUJITA, Y.; KURODA, M.; TANZAWA, K. Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Eur J Biochem*, v. 77, n. 1, pp. 31-36, jul. 1977.

ENSRUD, K. E.; BARRETT-CONNOR, E. L.; SCHWARTZ, A.; SANTORA, A. C.; BAUER, D. C.; SURYAWANSHI, S.; FELDSTEIN, A.; HASKELL, W. L.; HOCHBERG, M. C.; TORNER, J. C.; LOMBARDI, A. Randomized trial of effect of alendronate continuation versus discontinuation in women with low BMD: results from the Fracture Intervention Trial long-term extension. *J Bone Miner Res*, v. 19, n. 8, pp. 1259-1269, aug. 2004.

ESTANISLAU, I. M. G.; TERCEIRO, I. R.; LISBOA, M. R.; TELES, P. B.; CARVALHO, R. S.; MARTINS, R. S.; MOREIRA, M. M. Pleiotropic effects of statins on the treatment of chronic periodontitis – a systematic review. **Brit J Clin Pharmacol**, v. 79, n. 6, pp. 877-885, jun. 2015.

FAJARDO, M. E.; ROCHA, M. L.; SÁNCHEZ-MARIN, F. J.; ESPINOSA-CHÁVEZ E. J. Effect of atorvastatin on chronic periodontitis: a randomized pilot study. **J Clin Periodontol**, v. 37, n. 11, pp. 1016-1022, nov. 2010.

FARAG, M.; MOHAMED, M.; YOUSSEF, E. Assessment of hepatic function, oxidant/antioxidant status, and histopathological changes in rats treated with atorvastatin. Effect of dose and acute intoxication with acetaminophen. **Hum Exp Toxicol**, v. 34, n. 8, pp. 828-837, aug. 2014.

FENTOGLU, O.; KIRZIOGLU, F. Y.; OZDEM, M.; KOÇAK, H.; SUTÇU, R.; SERT, T. Proinflammatory cytokine levels in hyperlipidemic patients with periodontitis after periodontal treatment. **Oral Dis**, v. 18, n. 3, pp. 299-306, apr. 2012.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, F. J.; LÓPEZ-CABALLO, J. L.; CAÑIGRAL, A.; MENÉNDEZ-DÍAZ, I.; BRIZUELA, A.; DE COS, F. J.; COBO, T.; VEJA, J. A. Osteoprotegerin and zoledronate bone effects during orthodontic tooth movement. **Orthod Craniof Res**, oct. 2015.

FISHER, J. E.; ROGERS, M. J.; HALASY, J. M.; LUCKMAN, S. P.; HUGHES, D. E.; MASARACHIA, P. J.; WESOLOWSKI G.; RUSSEL, R. G.; RODAN, G. A.; RESZKA, A. A. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, n. 1, pp. 133-138, jan. 1999.

FLÓREZ-MORENO, G. A.; ISAZA-GUZMAN, D. M.; TOBON-ARROYAVE, S. I. Time-related changes in salivary levels of the osteotropic factors sRANKL and OPG through orthodontic tooth movement. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 143, n. 1, pp. 92-100, jan. 2013.

FRACALOSSO, A. C. C.; SANTAMARIA, M.; CONSOLARO, M. F. M. O.; CONSOLARO, A. Movimentação dentária experimental em murinos: períodos de observação e plano de cortes microscópicos. **Dental Press**, v. 14, n. 1, pp. 143-157, jan/fev. 2009.

FRAZEN, T. J.; ZAHRA, S. E.; EL-KADI, A.; VANDEVSKA-RADUNOVIC, V. The influence of low-level laser on orthodontic relapse in rats. **Eur J Orthod**, v. 37, n. 1, pp. 111-117, feb. 2015.

GARLET, T. P.; COELHO, U.; SILVA, J. S.; GARLET, G. P. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. **Eur J Oral Sci**, v. 115, n. 5, pp. 355-362, oct. 2007.

GARNETT, W. R. Interactions with hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. **Am J Health Syst Pharm**, v. 52, n. 15, pp. 1639-1645, aug. 1995.

GERTZ, B. J.; HOLLAND, S. D.; KLINE, W. F.; MATUSZEWSKI, B. K.; FREEMAN, A.; QUAN, H.; LASSETER K. C. MUCKLOW, J. C.; PORRAS, A. G. Studies of the oral bioavailability of alendronate. **Clin Pharmacol Ther**, v. 58, n. 3, pp. 288-298, sep. 1995.

GIUSTI, A.; HAMDY, N. A.; DEKKERS, O. M.; RAMAUTAR, S. R.; DIJKSTRA, S.; PAPAPOULOS, S. E. Atypical fractures and bisphosphonate therapy: a cohort study of patients with femoral fracture with radiographic adjudication of fracture site and features. **Bone**, v. 48, n. 5, pp. 966-971, may. 2011.

GKANTIDIS, N.; CHRISTOU, P.; TOPOUZELIS, N. The orthodontic-periodontic interrelationship in integrated treatment challenges: a systematic review. **J Oral Rehab**, v. 37, n. 5, pp. 377-390, may. 2010.

GLASS, D. A.; AHN, J. D.; STARBUCK, M.; PATEL, M. S.; CLEVERS, H.; TAKETO, M. M.; LONG, F.; MCMAHON, A. P.; LANG, R. A.; KARSENTY, G. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblast controls osteoclast differentiation. **Dev Cell**, v. 8, n. 5, pp. 751-764, may. 2005.

GOES, P.; MELO, I. M.; DUTRA, C. S.; LIMA, A. P.; LIMA, V. Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 11, pp. 1437-1544, nov. 2012.

GOES, P.; LIMA, A. P.; MELO, I. M.; RÊGO, R. O.; LIMA, V. Effect of atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in wistar rats. **Braz Dent J**, v. 21, n. 3, pp. 193-198, 2010.

GOES, P.; MELO, I. M.; SILVA, L. M.; BENEVIDES, N. M.; ALENCAR, N. M.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, V. Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature induced alveolar bone loss in rats. **J Periodontol Res**, v. 49, n. 1, pp. 45-54, feb. 2014.

GONZALES, C.; HOTOKEZAKA, H.; YOSHIMATSU, M.; YOZGATIAN, J. H.; DARENDELIER M. A.; YOSHIDA, N. Force magnitude and duration effects on amount of tooth movement and root resorption in the rat molar. **Angle Orthod**, v. 78, n. 3, pp. 502-509, may. 2008.

GRANT, M.; WILSON, J.; ROCK, P.; CHAPPLE, I. Induction of cytokines, MMP9, TIMPs, RANKL and OPG during orthodontic tooth movement. **Eur J Orthod**, v. 35, n. 5, pp. 644-651, oct. 2013

GREEN, J.; CZANNER, G.; REEVER, G.; WATSON, J.; WISE, L.; BERAL, V. Oral bisphosphonates and risk of cancer of oesophagus, stomach, and colorectum: case-control analysis withing a UK primary care cohort. **BMJ**, v. 341, pp. 1-8, sep. 2010.

HAKAMI, Z.; KITaura, H.; KIMURA, K.; ISHIDA, M.; SUGISAWA, H.; IDA, H.; JAFARI, S.; TAKANO-YAMAMOTO, T. Effect of interleukin-4 on orthodontic tooth

movement and associated root resorption. **Eur J Orthod**, v. 37, n. 1, pp. 87-94, feb. 2015.

HALCOX, J. P.; DEANFIELD, J. E. Beyond the laboratory: clinical implications for statin pleiotropy. **Circulation**, v. 109, pp. 42-48, jun. 2004.

HAN, G.; CHEN, Y.; HOU, J.; LIU, C.; CHEN, C.; ZHUANG, J.; MENG, W. Effect of simvastatin on relapse and remodeling of periodontal tissues after tooth movement in rats. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 138, n. 5, pp. 1-7, nov. 2010.

HAYASHI, N.; YAMAGUCHI, M.; NAKAJIMA, M.; UTSUNOMIYA, T.; YAMAMOTO, H.; KASAI, K. T-helper 17 cells mediate the osteo/odontoclastogenesis induced by excessive orthodontic forces. **Oral Dis**, v. 18, n. 4, pp. 375-388, may. 2012.

HELLER, I. J.; NANDA, R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement: an experimental study. **Am J Orthod**, v. 75, n.3, pp. 239-258, mar. 1979.

HORIUCHI, N.; MAEDA, T. Statins and bone metabolism. **Oral Dis**, v. 12, n. 2, pp. 85-101, mar. 2006.

HORWOOD, N. J.; KARTSOGIANNIS, V.; QUINN, J. M.; ROMAS, E.; MARTIN, T. J.; GILLESPIE, M. T. Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 265, n. 1, pp. 144-150, nov. 1999.

IMAI, K. Alendronate sodium hydrate (oral jelly) for the treatment of osteoporosis: review of a novel, easy to swallow formulation. **Clin Interv Aging**, v. 8, pp. 681-688, 2013.

ISTVAN, E. S.; DEISENHOFER, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. **Science**, v. 292, n. 5519, pp. 1160-1164, may. 2001.

ISTVAN, E. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. **Atheroscler Suppl**, v. 4, n. 1, pp. 3-8, mar. 2003.

IWAMOTO, J.; UZAWA, M. Experience with alendronate treatment for 7 years among Japanese men with osteoporosis or osteopenia and clinical risk factors for fractures. **Clin Rheumatol**, 2014.

JACOBSEN, W.; KUHN, B.; SOLDNER, A.; KIRCHNER, G.; SEWING, K. F.; KOLLMAN, P. A.; BENET, L. Z.; CHRISTIANS, U. Lactonization is the critical first step in the disposition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin. **Drug Metab Dispos**, v. 28, n. 11, pp. 1369-1378, nov. 2000.

JEONG, H. M.; JIN, Y. H.; CHOI, Y. H.; CHUNG, J. O.; CHO, D. H.; CHUNG, M. Y.; CIVITELLI, R.; CHUNG, D. J.; LEE, K. Y. Risedronate increases osteoblastic differentiation and function through connexin 43. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 432, n. 1, pp. 152-156, mar. 2013.

KAIPATUR, N. R.; WU, Y.; ADEEP, S.; STEVENSON, T. R.; MAJOR, P. W.; DOSCHAK, M. R. Impact of bisphosphonate drug burden in alveolar bone during orthodontic tooth movement in a rat model: a pilot study. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 144, n. 4, pp. 557-562, oct. 2013.

KAJI, H.; NAITO, J.; INOUE, Y.; SOWA, H.; SUGIMOTO, T.; CHIHARA, K. Statins suppresses apoptosis in osteoblastic cells: role of transforming growth factor-beta-Smad3-pathway. **Horm Metab Res**, v. 40, n. 11, pp. 746-751, nov. 2008.

KAKU, M.; MOTOKAWA, M.; TOHMA, Y.; TSUKA, N.; KOSEKI, H.; SUNAGAWA, H.; ARTURO MARQUEZ HERNADES, R.; OHTANI, J.; FUJITA, T.; KAWATA, T.; TANNE, K. VEGF and M-CSF levels in periodontal tissue during tooth movement. **Biomed Res**, v. 29, n. 4, pp. 181-187, aug. 2008.

KANZAKI, H.; CHIBA, M.; ARAI, K.; TAKAHASHI, I.; HARUYAMA, N.; NISHIMURA, M.; MITANI, H. Local RANKL gene transfer to the periodontal tissue accelerates orthodontic tooth movement. **Gene Ther**, v. 13, n. 8, pp. 678-685, apr. 2006.

KARRAS, J. C.; MILLER, J. R.; HODGES, J. S.; BEYER, J. P.; LARSON, B. E. Effect of alendronate on orthodontic tooth movement in rats. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 136, n. 6, pp. 843-847, dec. 2009.

KAWAZOE, A.; INUBUSHI, T.; MIYAUCHI, M.; ISHIKADO, A.; TANAKA, E.; TANNE, K.; TAKATA, T. Orally administered liposomal lactoferrin inhibits inflammation-related bone breakdown without interrupting orthodontic tooth movement. **J Periodontol**, v. 84, n. 10, pp. 1454-1462, oct. 2013.

KE, K.; SUL, O. J.; KIM, W. K.; LEE, M. H.; KO, M. S.; SUH, J. H.; KIM, H. J.; KIM, S. Y.; PARK, J. W.; CHOI, H. S. Overexpression of developmentally regulated GTP-binding protein-2 increases bone loss. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 304, n. 7, pp. 703-710, apr. 2013.

KHAN, A. A.; SANDOR, G. K.; DORE, E.; MORRISON, A. D.; ALSAHLI, M.; AMIN, F.; PETERS, E.; HANLEY, D. A.; CHAUDRY, S. R.; LENTLE, B.; DEMPSTER, D. W.; GLORIEUX, F. H.; NEVILLE, A. J.; TALWAR, R. M.; CLOKIE, C. M.; MARDINI, M. A.; PAUL, T.; KHOSLA, S.; JOSSE, R. G.; SUTHERLAND, S.; LAM, D. K.; CARMICHAEL, R. P.; BLANAS, N.; KENDLER, D.; PETAK, S.; STE-MARIE, L. G.; BROWN, J.; EVANS, A. W.; RIOS, L.; COMPSTON, J. E. Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw. **J Rheumatol**, v. 36, n. 3, pp. 478-490, mar. 2009.

KIM, J. Y.; LEE, E. Y.; LEE, E. B.; LEE, Y. J.; YOO, H. J.; CHOI, J.; SONG, Y. W. Atorvastatin inhibits osteoclastogenesis by decreasing the expression of RANKL in the synoviocytes of rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 14, n. 4, pp. 1-9, aug. 2012.

KIM, S. J.; KANG, Y. G.; PARK, J. H.; KIM, E. C.; PARK, Y. G. Effects of low-intensity laser therapy on periodontal tissue remodeling during relapse and retention of orthodontically moved teeth. **Lasers Med Sci**, v. 28, n. 1, pp. 325-333, jan. 2013.

KRIEGER, E.; JACOBS, C.; WALTER, C.; WEHRBEIN, H. Current state of orthodontic patients under bisphosphonate therapy. **Head Face Med**, v. 9, n.10, pp. 1-6, apr.. 2013.

KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. Cellular, molecular and tissue-level reactions to orthodontic force. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 129, n. 4, pp. 1-32, apr. 2006.

LACEY, D. L.; TIMMS, E.; TAN, H. L.; KELLEY, M. J.; DUNSTAN, C.R.; BURGESS, T.; ELLIOT, G.; SCULLY, S.; HSU, H.; SULLIVAN, J.; HAWKINS, N.; DAVY, E.; CAPPARELLI, C.; ELI, A.; QIAN, Y. X.; KAUFMAN, S.; SAROSI, I.; SHALHOUB, V.; SENALDI, G.; GUO, J.; DELANEY, J.; BOYLE, W. J. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell**, v. 93, n. 2, pp. 165-176, apr. 1998.

LAU, D.; MOLLNAU, H.; EISERICH, J. P.; FREEMAN, B. A.; DAIBER, A.; GEHLING, U. M.; BRUMMER, J.; RUDOLPH, V.; MUNZEL, T.; HEITZER, T.; MEINERTZ, T.; BALDUS, S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, n. 2, pp. 431-436, jan. 2005.

LEHENKARI, P. P.; KELLINSALMI, M.; NAPANKANGAS, J. P.; YLITALO, K. V.; MONKKONEN, J.; ROGERS M. J.; AZHAYEV, A.; VAANANEN, H. K.; HASSINEN, I. E. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. **Mol Pharmacol**, v. 61, n. 5, pp. 1255-1262, may. 2002

LI, F.; LI, G.; HU, H.; LIU, R.; CHEN, J.; ZOU, S. Effect of parathyroid hormone on experimental tooth movement in rats. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 144, n. 4, pp. 523-532, oct. 2013.

LIMA, V.; BRITO, G. A.; CUNHA, F. Q.; REBOUÇAS, C. G.; FALCÃO, B. A.; AUGUSTO, R. F.; SOUZA, M. L.; LEITÃO, B. T.; RIBEIRO, R. A. Effects of the tumour necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. **Eur J Oral Sci**, v. 113, n. 3, p. 210-217, jun. 2005.

LIU, Y.; CHENG, Z.; DING, L.; FANG, F.; CHENG, K. A.; FANG, Q.; SHI, G. P. Atorvastatin-induced acute elevation of hepatic enzymes and the absence of cross-toxicity of pravastatin. **Int J Clin Pharmacol Ther**, v. 48, n. 12, pp. 798-802, dec. 2010.

LOSSFORFER, S.; GOTZ, W.; JAGER, A. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) e its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. **Calcif Tissue Int**, v. 71, pp. 42-52, jul. 2002.

LOTWALA, R. B.; GREENLEE, G. M.; OTT, S. M.; HALL, S. H.; HUANG, G. J. Bisphosphonats as a risk factor for adverse orthodontic outcomes: a retrospective cohort study. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 142, n. 5, pp. 625-634, nov. 2012.

LUBBERTS, E.; OPPERS-WALGREEN, B.; PETTIT, A. R.; VAN DEN BERSSELAAR, L.; JOOSTEN, L. A. B.; GOLDRING, S. R.; GRAVALLESE, E. M.; VAN DER BERG, W. Increase in expression of receptor activator of nuclear factor κ B at sites of bone erosion correlates with progression of inflammation in evolving collagen-induced arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 46, n. 11, pp. 3055-3064, nov. 2002.

MAEDA, T.; MATSUNUMA, A.; KURAHASHI, I.; YANAGAWA, T.; YOSHIDA, H.; HORIUCHI, N. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. **J Cell Biochem**, v. 92, n. 3, pp. 458-471, jun. 2004.

MAIA, L. G.; ALVES, A. V.; BASTOS, T. S.; MOROMIZATO, L. S.; LIMA-VERDE, I. B.; RIBEIRO, M. A.; GANDINI JÚNIOR, L. G.; DE ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. Histological analysis of the periodontal ligament and alveolar bone during dental movement in diabetic rats subjected to low-level laser therapy. **J Photochem Photobiol**, v. 145, pp. 65-74, jun. 2014.

MAJIMA, T.; KOMATSU, Y.; FUKAO, A.; NINOMIYA, K.; MATSUMURA, T.; NAKAO, K. Short-term effects of atorvastatin on bone turnover in male patients with hypercholesterolemia. **Endocr J**, v. 54, n. 1, pp. 145-151, feb. 2007.

MANABE, N.; KAWAGUCHI, H.; CHIKUDA, H.; MIYAURA, C.; INADA, M.; NAGAI, R.; NABESHIMA, Y.; NAKAMURA, K.; SINCLAIR, A. M.; SCHEUERMANN, R. H.; KURO-O, M. Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. **J Immunol**, v. 167, n. 5, pp. 2625-2631, sep. 2001.

MARCACCINI, A. M.; AMATO, P. A.; LEÃO, F. V.; GERLACH, R. F.; FERREIRA, J. T. Myeloperoxidase activity is increased in gingival crevicular fluid and whole saliva after fixed orthodontic appliance activation. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 138, n. 5, pp. 613-616, nov. 2010.

MARON, D. J.; FAZIO, S.; LINTON, M. F. Current perspectives on statins. **Circulation**, v. 101, n. 2, pp. 207-213, jan. 2000.

MARQUEZAN, M.; BOLOGNESE, A. M.; ARAÚJO, M. T. Effects of two low-intensity laser therapy protocols on experimental tooth movement. **Photomed Laser Sug**, v. 28, n. 6, pp. 757-762, dec. 2010.

MEIKLE, M. C. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. **Eur J Orthod**, v. 28, n. 3, pp. 221-240, jun. 2006.

MENG, H.; XU, L.; LI, Q.; HAN, J.; ZHAO, Y. Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 43, pp. 133-159, 2007.

MIRHASHEMI A. H.; AFSHARI, M.; ALAEDDINI, M.; ETEMAD-MOGHADAM, S.; DEHPUR, A.; SHEIKHZADE, S.; AKHOUNDI, M. S. Effect of atorvastatin on orthodontic tooth movement in male wistar rats. **J Dent (Tehran)**, v. 10, n. 6, pp. 532-539, nov. 2013.

MITSUI, N.; SUZUKI, N.; MAENO, M.; MAYAHARA, K.; YANAGISAWA, M.; OTSUKA, K.; SHIMIZU, N. Optimal compressive force induces bone formation via increasing bone sialoprotein and prostaglandin E(2) production appropriately. **Life Sci**, v. 77, n. 5, pp. 3168-3182, nov. 2005.

MOHAMADNIA, A. R.; SHAHBAZKIA, H. R.; SHARIFI, S.; SHAFAEI, I. Bone-specific alkaline phosphatase as a good indicator of bone formation in sheepdogs. **Comparative Clinical Pathology**, v. 16, n. 4, pp. 265-270, jun. 2007.

MOHRI, T.; HANAD, K.; OZAWA, H. Coupling of resorption and formation on bone remodeling: influence in orthodontic tooth movement: a histochemical study. **J Bone Miner Metab**, v. 9, n. 2, pp. 57-69, aug. 1991.

MOON, S. J.; AHN, I. E.; JUNG, H.; YI, H.; KIM, J.; KIM, Y.; KWOK, S. K.; PARK, K. S.; MIN, J. K.; PARK, S. H.; KIM, H. Y.; JU, J. H. Temporal differential effects of proinflammatory cytokines on osteoclastogenesis. **Int J Mol Med**, v. 31, n. 4, pp. 769-777, apr. 2013.

MOSS, D. W.; WHITBY, L. G. A simplified heat-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. **Clin Chim Acta**, v. 61, n. 1, pp. 63-71, may. 1975.

MÜCK, W.; RITTER, W.; OCHMANN, K.; UNGER, S.; AHR, G.; WINGENDER, W.; KUHLMANN, J. Absolute and relative bioavailability of the HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin. **Int J Clin Pharmacol Ther**, v. 35, n. 6, pp. 255-260, jun. 1997.

MUKAIYAMA, K. Elevation of serum alkaline phosphatase (ALP) level in postmenopausal women is caused by high bone turnover. **Aging Clin Exp Res**, v. 27, n. 4, pp. 413-418, aug. 2015.

MUNDY, G. R. Statins and their potential for osteoporosis. **Bone**, v. 29, n. 6, pp. 495-497, dec. 2001.

MUNDY, G. R. Osteoporosis and inflammation. **Nutr Rev**, v. 65, n. 12, pp. 147-141, dec. 2007.

NAKANO, Y.; YAMAGUCHI, M.; FUJITA, S.; ASANO, M.; SAITO, K.; KASAI, K. Expressions of RANKL/RANK and M-CSF/c-fms in root resorption lacunae in rat molar by heavy orthodontic force. **Eur J Orthod**, v. 33, n. 4, pp. 335-343, aug. 2011.

NAKANO, T.; HOTOKEZAKA, H.; HASHIMOTO, M.; SIRISOONTORN, I.; ARITA, K.; KURUHAMA, T.; DARENDELIER, M. A.; YOSHIDA, N. Effects of different types of tooth movement and force magnitudes on the amount of tooth movement and root resorption in rats. **Angle Orthod**, v. 84, n. 6, pp. 1079-1085, nov. 2014.

NAKASHIMA, T.; KOBAYASHI, Y.; YAMASAKI, S.; KAWAKAMI, A.; EGUCHI, K.; SASAKI, H.; SAKAI, H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappa B ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 275, n. 3, pp. 768-775, sep. 2000.

NEVE, A.; CORRADO, A. CANTATORE, F. P. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. **Cell Tissue Res**, v. 343, n. 2, pp. 289-302, feb. 2011.

NEWMAN, C. B.; SZAREK, M.; COLHOUN, H. M.; BETTERIDGE, D. J.; DURRINGTON, P. N.; HITMAN, G. A.; NEIL, H. A.; DEMICCO, D. A.; AUSTER, S.; FULLER, J. H. The safety and tolerability of atorvastatin 10 mg in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS). **Diab Vasc Dis Res**, v. 5, n. 3, pp. 177-183, sep. 2008.

NIKLAS, A.; PROFF, P.; GOSAU, M.; ROMER, P. The role of hypoxia in orthodontic tooth movement. **Int J Dent**, 2013.

NISHIJIMA, Y.; YAMAGUCHI, M.; KOJIMA, T.; AIHARA, N.; NAKAJIMA, R.; KASAI, K. Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on release from periodontal ligament cells. **Orthod Craniofac**, v. 9, n. 2, pp. 63-70, may. 2006.

NUKAGA, J.; KOBAYASHI, M.; SHINKI, T.; SONG, H.; TAKADA, T.; TAKIGUCHI, T.; KAMIJO, R.; HASEGAWA, K. Regulatory effects of interleukin-1beta and prostaglandin E2 on expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in human periodontal ligament cells. **J Periodontol**, v. 75, n. 2, pp. 249-259, feb. 2004.

O'BRIEN, C. A.; NAKASHIMA, T.; TAKAYANAGI, H. Osteocyte control of osteoclastogenesis. **Bone**, v. 54, n. 2, pp. 258-263, jun. 2013.

ODVINA, C. V.; LEVY, S.; RAO, S.; ZERWEKH, J. E.; RAO, D. S. Unusual mid-shaft fractures during long-term bisphosphonate therapy. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 72, n. 2, pp. 161-168, feb. 2010.

OPPENHEIM, A. Tissue changes, particularly of the bone, incident tooth movement. **Am Orthod**, v. 3, pp. 57-67, 1911.

OROZCO, C.; MAALOUF, N. M. Safety of bisphosphonates. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 38, n. 4, pp. 681-705, nov. 2012.

PAGE, R. C.; KORNMAN, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **J Periodontol**, v. 14, pp. 9-11, jun. 1997.

PAN, B.; FARRUGIA, A. N.; TO, L. B.; FINDLAY, D. M.; GREEN, J.; LYNCH, K.; ZANNETTINO, A. C. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). **J Bone Miner Res**, v. 19, n. 1, pp. 147-154, jan. 2004.

PAN, H. Y.; DEVAULT, A. R.; WANG-IVERSON, D.; IVASHKIV, E.; SWANSON, B. N.; SUGERMAN, A. A. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of pravastatin and lovastatins. **J Clin Pharmacol**, v. 30, n. 12, pp. 1128-1135, dec. 1990.

PAPAPOULOS, S. E.; CREMERS, S. C. Prolonged bisphosphonate release after treatment in children. **N Engl J Med**, v. 356, n. 10, pp. 1075-1076, mar. 2007.

PÉREZ-CASTRILLÓN, J. L.; ABAD, L.; VEGA, G.; SANZ-CANTALAPIEDRA, A.; GARCIA-PORRERO, M.; PINACHO, F.; DUENAS, A. Effect of atorvastatin on bone mineral density in patients with acute coronary syndrome. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 12, n. 2, pp. 83-88, mar./abr. 2008.

PLOTKIN, L. I.; MALOLAGAS, S. C.; BELLIDO, T. Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. **Bone**, v. 39, n. 3, pp. 443-452, sep. 2006.

PRICE, U.; LE, H. O.; POWELL, S. E.; SCHMID, M. J.; MARX, D. B.; ZHANG, Y.; WANG, D.; NARAYANA, N.; REINHARDT, R. A. Effects of local simvastatin-alendronate conjugate in preventing periodontitis bone loss. **J Periodontol Res**, v. 48, n. 5, pp. 541-548, oct. 2013.

QUINN, J. M.; HORWOOD, N. J.; ELLIOTT, J.; GILLESPIE, M. T.; MARTIN, T. J. Fibroblastic stromal cells express receptor activator of NF-kappa B ligand and support osteoclast differentiation. **J Bone Miner Res**, v. 15, n. 8, pp. 1459-1466, aug. 2000.

RADULOVIC, L. L.; CILLA, D. D.; POSVAR, E. L.; SEDMAN, A. J.; WHITFIELD, L. R. Effect of food on the bioavailability of atorvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor. **J Clin Pharmacol**, v. 35, n. 10, pp. 990-994, oct. 1995.

RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **J Biol Chem**, v. 285, n. 33, pp. 103-107, aug. 2010.

RASMUSSEN, L.; ABTAHI, J. Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw: an update on pathophysiology, risk factors, and treatment. **Int J Dent**, pp. 1-8, 2014.

REDLICH, K.; SMOLEN, J. S. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 3, pp. 234-250, mar. 2012.

REINER, Z. Statins in the primary prevention of cardiovascular disease. **Nat Rev Cardiol**, v. 10, n. 8, pp. 453-464, aug. 2013.

REN, Y.; HAZEMEIJER, H.; DE HAAN, B.; QU, N.; DE VOS, P. Cytokine profiles in crevicular fluid during orthodontic tooth movement in short and long durations. **J Periodontol**, v. 78, n. 3, pp. 453-458, mar. 2007.

REN, Y.; MALTHA, J. C.; KUJIPERS-JAGTMAN, A. M. The rat as a model for orthodontic tooth movement—a critical review and a proposed solution. **Eur J Orthod**, v. 26, n. 5, pp. 483-490, oct. 2004.

RINCHUSE, D. J.; RINCHUSE, D. J.; SOSOVICKA, M. F.; ROBISON, J. M.; PENDLETON, R. Orthodontic treatment of patients using bisphosphonates: a report of 2 cases. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 131, n. 3, pp. 321-326, mar. 2007.

RODAN, G.; RESZKA, A.; GOLUB, E.; RIZZOLI, R. Bone safety of long-term bisphosphonate treatment. **Curr Med Res Opin**, v. 20, n. 8, pp. 1291-1300, aug. 2004.

ROGERS, M. J. From molds and macrophages to mevalonate: a decade of progress in understanding the molecular mode of action of bisphosphonates. **Calcif Tissue Int**, v. 75, n. 6, pp. 451-461, dec. 2004.

ROMAS, E.; GILLESPIE, M. T. Inflammation-induced bone loss: can it be prevented? **Rheum Dis Clin North Am**, v. 32, n. 4, pp. 759-773, nov. 2006.

RUAN, F.; ZHENG, Q.; WANG. Mechanism of bone anabolism regulated by statins. **Biosci Rep**, v. 32, n. 6, pp. 511-519, dec. 2012.

RUCCI, N. Molecular biology of bone remodeling. **Clin Cases Miner Bone Metab**, v. 5, no. 1, pp. 49-56, jan. 2008.

RUGGIERO, S. L.; DODSON, T. B.; ASSAEL, L. A.; LANDESBURG, R.; MARX, R. E.; MEHROTRA, B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-2009 update. **Aus Endod J**, v. 35, n. 3, pp. 119-130, dec. 2009.

RUSSEL, R.; WATTS, N. B.; EBETINO, F. H.; ROGERS, M. J. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. **Osteoporos Int**, v. 19, n. 6, pp. 733-759, jun. 2008.

RYDER, M. I. Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 53, pp. 124-137, jun. 2010.

SANDSTEDT, C. Einige Beiträge zur Theorie der Zahnregulierung. **Nordisk Tandlakare Tidskrift**, v. 5, pp. 236-256, 1904.

SANZ, M.; van WILKELHOLL, A. J. Periodontal infections: understanding the complexity-consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **J Clin Periodontol**, v. 38, n. 11, pp. 3-6, mar. 2011.

SASAKI, T. Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. **Microsc Res Tech**, v. 61, n. 6, pp. 483-495, aug. 2003.

SCHETT, G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. **Eur J Clin Invest**, v. 41, n. 2, pp. 1361-1366, may. 2011.

SHARMA, A.; PRADEEP, A. R. Clinical efficacy of 1% alendronate gel as a local drug delivery system in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial. **J Periodontol**, v. 83, n. 1, pp. 11-18, jan. 2012.

SHENKEIN, H. A. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. **Periodontol 2000**, v. 40, pp. 77-93, 2006.

SHIKAMA, Y.; NAGAI, Y.; OKADA, S.; OIZUMI, T.; SHIMAUCHI, H.; SUGAWARA, S.; ENDO, Y. Pro-IL-1 β accumulation in macrophages by alendronate and its prevention by clodronate. **Toxicol Lett**, v. 199, n. 2, pp. 123-128, nov. 2010.

SHIRAI, T.; KOBAYASHI, M.; NISHITANI, K.; SATAKE, T.; KUROKI, H.; NAKAGAWA, Y.; NAKAMURA, T. Chondroprotective effect of alendronate in a rabbit model of osteoarthritis. **J Orthop Res**, v. 29, n. 10, pp. 1572-1577, oct. 2011.

SHWARZ, A. M. Tissue changes incident to tooth movement. **Int J Orthod Oral Surg**, v. 18, pp. 331-352, 1932.

SILVERMAN, S. L. Paget disease of bone: therapeutic options. **J Clin Rheumatol**, v. 14, n. 5, pp. 299-305, oct. 2008.

SIMS, N. A.; MARTIN, T. J. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. **BoneKey Reports**, v. 3, n. 481, pp. 1-10, jan. 2014.

SINGH, S.; SINGH, P. P. Statin a day keeps cancer at bay. **World J Clin Oncol**, v. 4, n. 2, pp. 43-46, may. 2013.

SIRISOONTORN, I.; HOTOKEZAKA, H.; HASHIMOTO, M.; GONZALES, C.; LUPPANAPORNARP, S.; DARENDELILER, M. A.; YOSHIDA, N. Orthodontic tooth movement and root resorption in ovariectomized rats treated by systemic administration of zoledronic acid. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 141, n. 5, pp. 563-573, may. 2012.

SODAGAR, A.; ETEZADI, T.; MOTAHHARY, P.; DEHPOUR, A. H.; VAZIRI, H.; KHOJASTEH, A. The effect of celecoxib on orthodontic tooth movement and root resorption in rat. **J Dent (Tehran)**, v. 10, n.4, pp. 303-311, may. 2013.

SONG, C.; WANG, J.; SONG, Q.; LI, X.; CHEN, Z.; MA, Q.; LIU, Z.; JIA, H.; DANG, G. Simvastatin induces estrogen receptor-alpha (ER-alpha) in murine bone marrow stromal cells. **J Bone Miner Metab**, v. 26, n. 3, pp. 213-217, may. 2008.

STABILE, A. C.; STUANI, M. B.; LEITE-PANISSI, C. R.; ROCHA, M. J. Effects of short-term acetaminophen and celecoxib treatment on orthodontic tooth movement and neuronal activation in rat. **Brain Res Bull**, v. 79, n. 6, pp. 396-401, aug. 2009.

SURESH, S.; NARAYANA, S.; JAYAKUMAR, P.; SUDHAKAR, U.; PRAMOD, V. Evaluation of anti-inflammatory effect of statins in chronic periodontitis. **Indian J Pharmacol**, v. 45, n. 4, pp. 391-394, jul./aug. 2013.

TARVADE, S. M.; DAOKAR, S. G. Osteoporosis and Orthodontics: A Review. **SJOD**, v. 1, n.1, pp. 26-29, nov./dec. 2014.

TAN, L.; REN, Y.; WANG, J.; JIANG, L.; CHENG, H.; SANDHAM, A.; ZHAO, Z. Osteoprotegerin and ligand of receptor activator of nuclear factor kappaB expression

in ovariectomized rats during tooth movement. **Angle Orthod**, v. 79, n. 2, pp. 292-298, mar. 2009.

TEIXEIRA, C. C.; KHOO, E.; TRAN, J.; CHARTRES, I.; LIU, Y.; THANT, L. M.; KHANBENSKY, I.; GART, L. P.; CISNEROS, G.; ALIKHANI, M. Cytokine expression and accelerated tooth movement. **J Dent Res**, v. 89, n. 10, pp. 1135-1141, oct. 2010.

TONG, H.; HOLSTEIN, S. A.; HOHL, R. J. Simultaneous determination of farnesyl and geranylgeranyl pyrophosphatase levels in cultured cells. **Anal Biochem**, v. 336, n. 1, pp. 51-59, jan. 2005.

TOPKARA, A.; KARAMAN, A. I.; KAU, C. H. Apical root resorption caused by orthodontic forces: A brief review and a long-term observation. **Eur J Dent**, v. 6, pp. 445-453, oct. 2012.

TSE, F. L.; JAFFE, J. M.; TROENDLE, A. Pharmacokinetics of fluvastatin after single and multiple doses in normal volunteers. **J Clin Pharmacol**, v. 32, n. 7, pp. 630-638, jul. 1992.

TSUCHIYA, M.; AKIBA, Y.; TAKAHASHI, I.; SASANO, Y.; KASHIWAZAKI, J.; TSUCHIYA, S.; WATANABE, M. Comparison of expression patterns of cathepsin K and MMP-9 in odontoclasts and osteoclasts in physiological root resorption in the rat molar. **Arch Histol Cytol**, v. 71, n. 2, pp. 89-100, sep. 2008.

TUNCER, B. B.; OZMERIC, N.; TUNCER, C.; TEOMAN, I.; CAKILCI, B.; YUCEL, A.; ALPAR, R.; BALOS, K. Levels of interleukin-8 during tooth movement. **Angle Orthod**, v. 75, n. 4, pp. 631-636, jul. 2005.

TYROVOLA, J. B.; SPYROPOULOS, M. N.; MAKOU, M.; PERREA, D. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini-review. **J Oral Sci**, v. 50, n. 4, pp. 367-376, dec. 2008.

VEILLARD, N. R.; MACH, F. Statins: the new aspirin? **Cell Mol Life Sci**, v. 59, n. 11, pp. 1771-1786, nov. 2002.

VIERECK, V.; EMONS, G.; LAUCK, V.; FROSH, K. H.; BLASCHKE, S.; GRUNDKER, C.; HOFBAUER, L. C. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. **Biochem Biohys Res Commun**, v. 291, n. 3, pp. 680-686, mar 2002.

VON BÖHL, M.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M. Hyalinization during orthodontic tooth movement: a systematic review on tissue reactions. **Eur J Orthod**, v. 31, n. 1, pp. 30-36, fev. 2009.

VON BÖHL, M.; MALTHA, J.C.; VON DEN HOFF, J.W.; KUIJPERS-JAGTMAN, A.M. Focal hyalinization during experimental tooth movement in beagle dogs. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 125, n. 5, p. 615-626, may. 2004.

WALSH, M. C.; KIM, N.; KADONO, Y.; RHO, J.; LEE, S. Y.; LORENZO, J.; CHOI, Y. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. **Annu Rev Immunol**, v. 24, pp. 33-63, 2006.

WANG, Y.; GAO, S.; JIANG, H.; LIN, P.; BAO, X.; ZHANG, Z.; HU, M. Lithium chloride attenuates root resorption during orthodontic tooth movement in rats. **Exp Ther Med**, v. 7, n. 2, pp. 468-472, feb. 2014.

WATTED, N. Influence of drugs on orthodontic tooth movement. **J Res Med Dent Sci**, v. 2, n. 4, pp. 1-8, oct./dec. 2014.

WATTS, N. Bisphosphonates, Statins, Osteoporosis and Atherosclerosis. **South Med J**, v. 96, n. 6, pp. 578-582, jun. 2002.

WATTS, N. B.; DIAB, D.L. Long-term use of bisphosphonates in osteoporosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 4, pp. 1555-1565, apr. 2010.

WEIVODA, M. M.; HOHL, R. J. The effects of direct inhibition of geranylgeranyl pyrophosphate synthase on osteoblast differentiation. **J Cell Biochem**, v. 112, n. 6, pp. 1506-1513, jun. 2011.

WELTMAN, B.; VIG, K. W.; FIELDS, H. W.; SHANKER, S.; KAIZAR, E. E. Root resorption associated with orthodontic tooth movement: a systematic review. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 137, n. 4, pp. 462-476, apr. 2010.

WESTENDORF, J. J.; KAHLER, R. A.; SCHROEDER, T.M. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. **Gene**, v. 341, pp. 19-39, oct. 2004.

WILLIAMS, D.; FEELY, J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. **Clin Pharmacokinetic**, v. 41, n. 5, pp. 343-370, 2002.

WONG, R. W.; RABIE, A. B. Early healing pattern of statin-induced osteogenesis. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 43, n. 1, pp. 46-50, feb. 2005.

YANG, Q.; MCHUGH, K. P.; PATNITIRAPONG, S.; GU, X.; WUNDERLICH, L.; HAUSCHKA, P. V. VEGF enhancement of osteoclast survival and bone resorption involves VEGF receptor-2 signaling and beta3-integrin. **Matrix Biol**, v. 27, n. 7, pp. 589-599, sep. 2008. .

YASUDA, H.; SHIMA, N.; NAKAGAWA, N.; YAMAGUCHI, K.; KINOSAKI, M.; MOCHIZUKI, S.; TOMOYASU, A.; YANO, K.; GOTO, M.; MURAKAMI, A.; TSUDA, E.; MORINAGA, T.; HIGASHIO, K.; UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N.; SUDA, T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 31, n. 7, pp. 3597-3602, mar. 1998.

YAVROPOULOU, M. P.; YOVOS, J. G. Osteoclastigenesis – current knowledge and future perspectives. **J Musculoskelet Neronal Interact**, v. 8, n. 3, pp. 204-216, jul./sep. 2008.

YOKOYA, K.; SASAKI, T.; SHIBASAKI, Y. Distributional changes of osteoclasts and pre-osteoclastic cells in periodontal tissues during experimental tooth movement as revealed by quantitative immunohistochemistry of H(+)-ATPase. **J Dent Res**, v. 76, n. 1, pp. 580-587, jan. 1997.

ZAHROWSKI, J. J. Optimizing orthodontic treatment in patients taking bisphosphonates for osteoporosis. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 135, n. 3, pp. 361-374, mar. 2009.

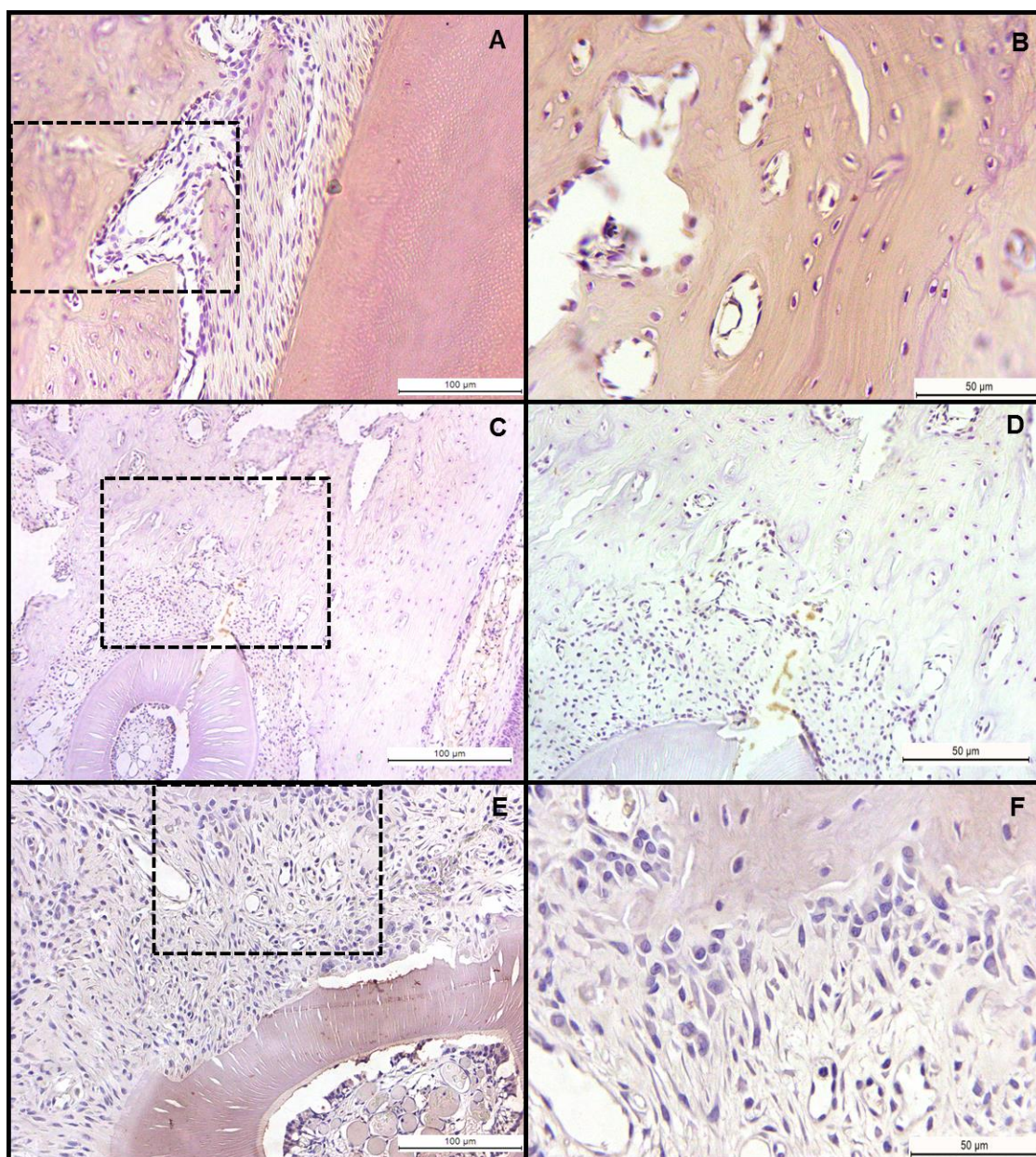
ZAINAL-ARIFFIN, S. H.; YAMAMOTO, Z.; ZAINOL-ABIDIN, I. Z.; MEGAT ABDUL WANAB, R.; ZAINAL-ARIFFIN, Z. Cellular and molecular changes in orthodontic tooth movement. *Schientific World Journal*, 2011.

ZHANG, D.; UDAGAWA, N.; NAKAMURA, I.; MURAKAMI, H.; SAITO, S.; YAMASAKI, Y.; SHIBASAKI, Y.; MORII, N.; NARUMIYA, S.; TAKAHASHI, N. The small GTP-binding protein, rho p21, is involved in bone resorption by regulating cytoskeletal organization in osteoclasts. **J Cell Sci**, v. 108, n. 6, pp. 2285-2292, jun 1995.

ZHANG, Y.; BRADLEY, A. D.; WANG, D.; REINHARDT, R. A. Statins, bone metabolism and treatment of bone catabolic diseases. **Pharmacol Res**, v. 88, pp. 53-61, oct. 2014.

ZUPAN, J.; JERAS, M.; MARC, J. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. **Biochem Med (Zagreb)**, v. 23, n. 1, pp. 43-63, 2013

APÊNDICE A - Controles negativos para a análise imunohistoquímica de RANKL, OPG e TRAP.



(A,B) Controle negativo de RANKL; (C,D) Controle negativo de OPG; (E,F) Controle negativo de TRAP. (A, C, E) aumento de 200x; (B, D, F) aumento de 400x, cujas barras indicam 100 µm e 50 µm, respectivamente.

ANEXO – Declaração do Comitê de Ética

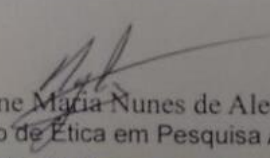


Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 21/2014, sobre o projeto intitulado: “AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO DE ATORVASTATINA E ALENDRONATO NA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS: PARTICIPAÇÃO DA VIA RANK-RANKL-OPG”, de responsabilidade da Profa. Dra. Vílma de Lima e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 16 de maio de 2014.

Fortaleza, 16 de maio de 2014


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Profa. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar
Coordenadora da CEPADFF/FAMED/UFCE
MAT. SIAPE 2166369