



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

FÁTIMA REGINA NUNES DE SOUSA

**EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA
INDUZIDA EM RATOS**

FORTALEZA

2018

FÁTIMA REGINA NUNES DE SOUSA

**EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA
INDUZIDA EM RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Morfofuncionais, da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
Morfofuncionais.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Renata de Carvalho
Ferreira Leitão.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S696e Sousa, Fátima Regina Nunes de.
Efeito do Ácido Zoledrônico na Movimentação Dentária Induzida em ratos / Fátima Regina Nunes de Sousa. – 2018.
108 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.
1. Bisfosfonatos. 2. Movimentação dentária ortodôntica. 3. Reabsorção da raiz. I. Título.

CDD 611

FÁTIMA REGINA NUNES DE SOUSA

**EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA
INDUZIDA EM RATOS**

Aprovada em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Virgínia Cláudia Carneiro Girão
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Pedro César Fernandes dos Santos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Dedico à Deus, minha fonte de fé e sabedoria. Aos meus pais que sempre acreditaram e incentivaram os meus sonhos, aos meus filhos Ana Luiza e Antônio Gabriel que são minha fonte de inspiração, ao meu esposo Gleison pelo amor e companheirismo, aos meus irmãos pelo apoio e amor em todas as fases do meu trabalho, aos meus tios, primos e amigos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. **Dra Renata Ferreira de Carvalho Leitão** pela condução deste trabalho com tanta firmeza e leveza que somente os grandes professores tem a sensibilidade de compartilhar. Obrigada pelos incentivos, por acreditar e estimular os seus alunos na busca da concretização dos objetivos. Sempre será uma referência de professora na minha trajetória acadêmica.

Ao Prof. **Dr. Ronaldo Ribeiro** (*in memoriam*), que me acolheu como sua doutoranda, embora por um período curto, mas o suficiente para que os ensinamentos de um grande mestre fossem transmitidos.

Aos Professores Doutores **Gerly Anne de Castro Brito, Virgínia Cláudia de Carneiro Girão, Ricardo Dias de Castro e Pedro César Fernandes dos Santos** pelas considerações fundamentais para o aprimoramento deste trabalho.

Aos professores Doutores **Paula Góes e Paulo Goberlânio** pelas correções e contribuição por ocasião do exame de qualificação do doutorado.

Aos meus **professores** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais (**PCMF**), agradeço pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Professor Doutor **Frederico Barbosa de Sousa**, pela imensa contribuição neste trabalho nas análises de microtomografia computadorizada.

À doutoranda **Vanessa Costa**, pelo companheirismo e cumplicidade durante o planejamento e desenvolvimento deste trabalho.

Ao mestrando **Hugo Dantas** do Programa de Pós Graduação em Odontologia (UFPB), pela dedicação e desempenho nas avaliações da micro CT.

Aos colegas de turma do doutorado **Theídes, Patrícia, Antonione, Hildênia e Eduardo** pela companhia, torcida e vontade de compartilhar os ensinamentos.

Agradeço a todos os **colegas e amigos do laboratório NEMPI**, em especial a **Josi**, no qual me identifico pela história de vida, pela simplicidade, sabedoria e pelo coração generoso, à Deiziane, Cíntia, Mariana Viana, Gildênio, Ariel, Bruno, Raquel, Dvison, Luciany, Ketman, Luana, Helson e Jonas.

Aos **estudantes de iniciação científica**: Guilherme, Letícia, Mateus, Karla Kaiany, Eula Karla, Mariane, Lara e Mayara pela dedicação e disponibilidade em todas as etapas deste trabalho.

Aos técnicos queridos do laboratório Nempi, **Júnior e Flávia**, pelos serviços prestados com competência e destreza, enriquecendo esta tese com o trabalho impecável na confecção das lâminas.

À secretária do PCMF, **Laísa**, por sempre nos orientar e esclarecer as dúvidas referentes à parte burocrática do curso.

Ao técnico do laboratório do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, **Davi** pela acessibilidade e disponibilidade dos equipamentos.

A **Universidade Federal do Ceará** por viabilizar a conclusão desse importante momento.

À **Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pró-Equipamentos CAPES** pelas excelentes imagens obtidas e pela aquisição das imagens de imunofluorescência no confocal e microscopia eletrônica de varredura.

Ao Laboratório de microscopia e imagem biológica (**LAMIB**) do departamento de Morfologia da Universidade Federal da Paraíba.

A **CRISTÁLIA**, produtos químicos farmacêuticos LTDA., pelo apoio a pesquisa com a doação de ampolas de Ácido Zoledrônico.

À **Morelli Ortodontia**, pelo apoio à pesquisa, com doação de dispositivos ortodônticos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus**, pela graça de realizar mais um sonho, de permitir que eu compreenda e entenda sempre os seus desígnios. Agradeço pela força, determinação e coragem que estiveram sempre do meu lado porque sentia sempre a companhia do Senhor me conduzindo.

Aos meus pais, **Pedro e Luzia**, que me ensinaram da forma mais simples, como eles sabem transmitir, que sonhos são realizados e que o limite é a determinação. Todas as minhas conquistas foram possíveis porque vocês acreditaram.

Aos meus filhos **Ana Luiza e Antônio Gabriel** por me deixarem plena e feliz com a presença de vocês. Meus filhos são minha maior fonte de inspiração, foi onde recarreguei minhas forças, renovei os sonhos e me dediquei para conseguir as vitórias que Deus permitiu conquistar.

Ao meu esposo, **Gleison**, por viver os meus sonhos comigo, e por se dedicar aos nossos filhos em todas as minhas ausências, sempre compreendendo e incentivando. Obrigada por tanto amor, cuidado e companheirismo.

Aos meus irmãos, **Jouilson, Pedro Filho e Rodolfo**, pelo amor, aos meus tios **João**, pela acolhida, **Tia Fátima, Luza e Luzimar**, pelo apoio, e primos, pela torcida. Dedico esta conquista à **minha família**, que sempre souberam que nas dificuldades da vida, a educação seria a melhor forma de escrever uma nova história.

À minha dupla na pesquisa e a amiga que ganhei na minha vida, **Vanessa Costa**, pela sua companhia no planejamento e execução deste trabalho, além de compartilhar as minhas alegrias e angústias durante todo o ciclo do doutorado. A sua amizade foi fundamental para me deixar centrada e focada nos meus objetivos.

À amizade de **Theídes Batista e Patrícia Teles**, amigas que foram essenciais em permitir que este período fosse menos estressante, mais suave e feliz. Fomos cúmplices em todos os momentos do doutorado, com vocês demonstrei toda a minha essência, fraquezas e vitórias. E em todos os nossos

momentos de desopilar tínhamos sempre a mesma opinião que a conclusão da nossa pesquisa era a amizade.

Aos **meus alunos**, que me despertou o interesse pela docência e pesquisa, a convivência e aprendizado com vocês me faz uma pessoa renovada a cada dia.

À todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O ácido zoledrônico (AZ) é um potente bisfosfonato que se liga fortemente à hidroxiapatita da superfície óssea e atua preferencialmente em sítios de grande formação e reabsorção óssea, sendo utilizado no tratamento de patologias ósseas. Este estudo objetiva avaliar os efeitos do Ácido Zoledrônico (AZ) durante a movimentação dentária induzida (MDI) em ratos, em um modelo experimental que simula as doses e via de administração do AZ de pacientes tratados com desordens metabólicas ósseas. Foram utilizados 83 ratos Wistar (180-220 g) divididos em duas fases experimentais. Na primeira fase foram avaliados diferentes períodos de MDI (1,4,7,11,14 e 21 dias), com finalidade de avaliar o dia ideal para estudar o efeito do AZ. Foram instaladas molas de NiTi no primeiro molar superior esquerdo com força de 50gf permitindo a MDI. Os animais foram sacrificados e a maxila foi removida para análises histológicas e histométricas óssea e radicular. O dia 21 houve maior reabsorção radicular e deslocamento dentário e o dia 4 maior número de osteoclastos e áreas hialínicas quando comparado ao dia 0 ($p < 0,05$). Na segunda fase os animais foram divididos em 04 grupos: Naive (N), Salina (SAL), Ácido Zoledrônico com concentração de 0,2 mg/kg (AZ/0,2) e Ácido Zoledrônico com concentração de 1,0 mg/kg (AZ/1,0). Todos os grupos, exceto o naive foram instaladas molas de NiTi no primeiro molar superior esquerdo com força de 50gf permitindo a MDI por um período de 4 e 21 dias. A administração do AZ (0,2 e 1,0 mg/kg, i.v) foi realizada durante 3 semanas consecutivas e a última dose no D42 com a MDI. Estes animais foram eutanasiados no D46 e D63. As maxilas foram removidas para análises macroscópica, histopatológica, histométrica, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microtomografia computadorizada, análise do percentual de perda óssea por microscopia confocal, análise de colágeno por coloração de Picrosirius Red sob luz polarizada, análise dos vasos sanguíneos por coloração de Mallory, e amostras sanguíneas foram coletadas para dosagens bioquímicas. O tratamento com AZ diminuiu a MDI, osteoclastos e nível de perda óssea no osso alveolar quando comparado ao grupo naive e salina ($p < 0,05$). No ligamento periodontal observou-se aumento das áreas hialínicas no lado de compressão e redução da vascularização no lado de tração ($p < 0,05$). No MEV, verificou-se redução da reabsorção radicular nos grupos tratados com AZ quando comparado com o grupo salina. O tratamento com AZ não alterou o percentual de colágeno tipo I e III, mas reduziu os níveis de cálcio e fosfatase alcalina quando comparado ao naive ($p < 0,05$). Em suma, os resultados deste estudo mostraram que o AZ interfere na MDI, apresentando seus efeitos anti-reabsortivos a nível ósseo e dentário, e que embora seja visualizado efeito na redução da vascularização, a estrutura óssea foi preservada com vitalidade das células, desta forma o uso do ácido zoledrônico não é um fator de risco para a osteonecrose da maxila no modelo experimental em ratos.

Palavras-chaves: Bisfosfonatos- Movimentação dentária ortodôntica – Reabsorção da Raiz

ABSTRACT

Zoledronic acid (ZA) is a potent bisphosphonate that binds to the hydroxyapatite of the bone surface and acts preferentially in sites of bone formation and resorption, being used in the treatment of bone pathologies. This study aims to evaluate the effects of Zoledronic Acid (ZA) during induced tooth movement (ITM) in rats, in an experimental model that simulates the doses and route of administration of ZA in patients treated with bone metabolic disorders. Wistar rats (180-220 g) divided into two experimental phases were used. In the first phase, different periods of ITM were evaluated (1,4,7,11,14 and 21 days), in order to determine the ideal day to study the effect of ZA. NiTi springs were installed in the first left maxillary molar with 50N allowing the ITM. The maxilla was removed. Histological and histometric analyzes of bone and tooth root were performed. On day 21 greater root resorption and tooth displacement were observed, and on day 4, more osteoclasts and necrotic areas were observed when compared to day 0 ($p < 0.05$). In the second phase, four groups were divided: Naive (N), Saline (SAL), Zoledronic Acid with a concentration of 0.2 mg/kg (ZA/0,2) and Zoledronic Acid with a concentration of 1.0 mg/kg (ZA/1.0). All groups, except naive, were submitted to NiTi springs installation in the first left maxillary molar with a force of 50g allowing ITM for a period of 4 and 21 days. Administration of ZA (0.2 and 1.0 mg/kg, iv) was performed for 3 consecutive weeks and on day 42, just before the insertion of the springs. These animals were euthanized on days 46 and 63. Jaws were removed for macroscopic and histopathological analyzes (using HE, Picrosirius Red, Mallory), scanning electron microscopy (SEM), computerized microtomography and confocal microscopy. The following parameters were analyzed: bone and root resorption, tooth movement, collagen analysis and blood vessel count. Blood samples were collected for biochemical measurements of alkaline phosphatase, phosphorus and calcium. Treatment with ZA decreased the ITM and the number of osteoclasts and loss of alveolar bone when compared to the naive and saline groups ($p < 0.05$). Treatment with ZA also increased necrotic areas in the periodontal ligament and reduced vascularization ($p < 0.05$). Reduction of radicular resorption was observed in the groups treated with ZA when compared with the saline group. There were no significant changes in the percentage of type I collagen and III between the saline and ZA groups, at any of the concentrations used. In summary, the results of this study show that ZA interferes with ITM and presents anti-resorptive effects on bone and dental tissues associated with decreased of vessel numbers without osteonecrosis. The use of zoledronic acid, therefore, is not a risk factor for the development of maxillary osteonecrosis in the experimental model of ITM used in the present study.

Key-wohrs: Bisphosphonates - orthodontic tooth movement - root resorption

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Expressão das proteínas RANK/RANKL/OPG nas células ósseas	22
Figura 2-	Lado de tração do ligamento periodontal na movimentação dentária	25
Figura 3-	Lado de compressão do ligamento periodontal na movimentação dentária	26
Figura 4-	Eixo RANK/RANKL/OPG na movimentação dentária	27
Figura 5-	Estrutura química geral dos bisfosfonatos e do pirofosfato endógeno	29
Figura 6-	Direção da força aplicada na movimentação dentária induzida, com mesialização do molar superior esquerdo e ancoragem nos dentes incisivos	37
Figura 7-	Representação esquemática do desenho experimental da avaliação do AZ na movimentação dentária induzida	39
Figura 8-	Fotomicrografia das 5 raízes (MV, INT, DV, MP E DP) do primeiro molar superior, em corte transversal.	41
Figura 9-	Fotomicrografia do corte transversal da raiz DV com a delimitação de ângulo de 120°, delimitando as áreas de compressão e tração	43
Figura 10-	Fotomicrografia do corte transversal da raiz DV com a delimitação de áreas hialínicas no LP	44
Figura 11-	Fotomicrografia do corte transversal da raiz DV com a delimitação de ângulo de 30°	46
Figura 12-	Representação gráfica da taxa de movimentação dentária nos dias (1,4,7,11,14 e 21)	54
Figura 13-	Fotomicrografia de cortes transversais da raiz distovestibular em diferentes dias da MDI	56
Figura 14-	Análise histomorfométrica da raiz DV no lado de tração e compressão do ligamento periodontal	57
Figura 15-	Análise histomorfométrica da raiz DV das áreas hialínicas do ligamento periodontal	58
Figura 16-	Análise do número de osteoclastos no osso alveolar do primeiro molar superior	59
Figura 17-	Taxa da movimentação dentária no período de 21 dias com a administração do AZ	61
Figura 18-	Análise das imagens obtidas por micro CT do efeito do AZ com 21 dias da MDI	62
Figura 19-	Análise histopatológica do efeito do AZ na distensão e compressão do ligamento periodontal.	63
Figura 20-	Fotomicrografia de cortes transversais da raiz distovestibular para análise da distensão e compressão do LP nos grupos experimentais Naive, Salina, AZ (0,2) e AZ (1,0)	64
Figura 21-	Análise histopatológica do efeito do AZ na quantidade de áreas hialínicas do LP nos grupos experimentais Naive, Salina, AZ (0,2) e	65

AZ (1,0)

Figura 22-	Análise histopatológica do efeito do AZ na quantificação dos osteoclastos	66
Figura 23-	Fotomicrografia de cortes transversais da raiz distovestibular para análise da quantificação dos osteoclastos nos grupos experimentais Naive, Salina, AZ (0,2) e AZ (1,0)	67
Figura 24-	Fotomicrografia com corte transversal da raiz DV para análise do efeito do AZ na reabsorção radicular no período de 21 dias da MDI	69
Figura 25-	Análise histopatológica do efeito do AZ na quantidade percentual da perda óssea alveolar do lado de compressão	70
Figura 26-	Fotomicrografia do corte transversal da raiz DV analisada por microscopia confocal em diferentes grupos experimentais	71
Figura 27-	Análise da relação do colágeno tipo I/ tipo III no ligamento periodontal do lado de tração	72
Figura 28-	Fotomicrografia do corte transversal da raiz DV coradas com <i>picrosirius red</i> e sob filtro de luz polarizada nos grupos experimentais N, Sal, AZ (0,2) e AZ (1,0)	73
Figura 29-	Análise histopatológica do efeito do AZ na quantidade de vasos sanguíneos por área $10^4 \mu\text{m}^2$	74
Figura 30-	Análise histopatológica do efeito do AZ no percentual da área dos vasos sanguíneos	75
Figura 31-	Fotomicrografia da análise dos vasos sanguíneos no ligamento periodontal com efeito do AZ, através da coloração de <i>Mallory</i>	76
Figura 32-	Eletrofotomicrografia do efeito do AZ na superfície radicular com 21 dias de MDI, análise por MEV com magnitude de 100x	77
Figura 33-	Eletrofotomicrografia da análise por MEV, efeito do AZ na raiz MV no período de 21 dias de MDI, com magnitude de 600x	78
Figura 34-	Medidas de densidade de volume ósseo da densidade da fração de volume do osso/volume total (BV/TV) no lado de compressão do osso alveolar da raiz distovestibular	79
Figura 35-	Medidas de densidade de número de trabéculas (Tb.N), espessura (Tb.Th) e separação entre as trabéculas (Tb.Sp) no lado de compressão do osso alveolar da raiz distovestibular	80
Figura 36-	Medidas de densidade de número de trabéculas (Tb.N), espessura (Tb.Th) e separação entre as trabéculas (Tb.Sp) no lado de tração do osso alveolar da raiz distovestibular	81
Figura 37-	Análise do volume da cortical óssea do fêmur em mm^3	82
Figura 38-	Análise do diâmetro medular (mm) do canal medular do fêmur	82
Figura 39-	Efeito do AZ sobre a imunomarcagem de OPG presentes nas células do tecido ósseo nos grupos experimentais Naive, Salina, AZ (0,2) e AZ (1,0)	83
Figura 40-	Fotomicrografia do efeito do AZ nas células imunomarcadas com OPG no tecido ósseo	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Escores referentes à reabsorção radicular no lado de compressão	46
Tabela 2-	Análise da reabsorção radicular da raiz DV em diferentes dias da MDI	60
Tabela 3-	Análise do efeito do AZ na reabsorção radicular em diferentes grupos experimentais N, Sal, AZ (0,2) e AZ (1,0)	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- μL** - Microlitro (s)
- ANOVA** - Análise de variância
- AZ** – Ácido Zoledrônico
- BFs** – Bisfosfonatos
- Cm** - Centímetro (s)
- DV**- distovestibular
- Dp** - Desvio-Padrão
- DP**- distopalatino
- DKK** – Dickkopf
- E.P.M** - Erro padrão da média
- ELISA** – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- Et al.** - ...e colaboradores
- FAO** – Fosfatase Alcalina Óssea
- g** – gramas
- H** - Hora (s)
- HE** - Hematoxilina-Eosina
- INT**- intermediária
- i.p** – intraperitoneal
- IL-1β** - Interleucina-1
- IL-6** - Interleucina-6
- Kg** – Kilograma Md – Mediana
- LP**- Ligamento Periodontal
- Micro-CT** - microtomografia computadorizada
- MDI**- Movimentação dentária induzida
- MEV**- Microscopia eletrônica de varredura
- Mg** – Miligrama
- MI** – Mililitro
- MP**- mesiopalatino

MSE – Molares superiores esquerdo

MV- Mesiovestibular

PBS - Tampão fosfato-salino (phosphate buffered saline)

PDGF - Fator de crescimento derivado das plaquetas

OMB – Osteonecrose dos maxilares

OPG – osteoprotegerina

Pg - Picograma (s)

PMN - Polimorfonucleares

RR – Reabsorção radicular

RANK – Receptor ativador do fator nuclear κ b

RANKL – Ligante do Receptor do Fator Nuclear Kappa beta

SAL – Salina

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa (tumoral necrosis factor- alpha)

UFC – Universidade Federal do Ceará

UI – Unidades Internacionais

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Wnt – Wingles

LISTA DE SÍMBOLOS

% Porcentagem

© Copyright

® Marca Registrada

α Alfa

B Beta

™ Trade Mark

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Metabolismo ósseo	19
2.2 Movimentação dentária induzida	24
2.3 Bisfosfonatos	28
2.4 Ácido Zoledrônico e Movimentação dentária	31
3 JUSTIFICATIVA	33
4 OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo Geral	34
4.2 Objetivos Específicos	34
5 MATERIAS E MÉTODOS	35
5.1 Desenho do estudo e aspectos éticos	35
5.2 Seleção de animais	35
5.3 Modelo de movimentação dentária induzida	36
5.4 Procedimentos de eutanasia	38
5.5 Primeira fase do estudo: estabelecimento do delineamento experimental	38
5.6 Segunda fase do estudo: avaliação do efeito do ácido zoledrônico (AZ) na movimentação dentária induzida e nas alterações dentárias e periodontais	38
5.7 Parâmetros avaliados	40
5.7.1 Mensuração da movimentação dentária	40
5.7.2 Avaliação histopatológica – avaliação da porção orgânica do dente e periodonto	40
5.7.3 Avaliação da porção inorgânica do dente (dentina e cimento), osso maxilar e fêmur	49
5.7.4 Análise da imunomarcção da proteína OPG em células ósseas	52
5.7 Análise estatística	53
6 RESULTADOS	54
6.1 Curva temporal da movimentação dentária	54
6.2 Avaliação histopatológica da porção orgânica do dente e periodonto – primeira fase do estudo	55
6.3 Mensuração da movimentação dentária	61

6.4 Avaliação histopatológica – porção orgânica do dente e periodonto -----	62
6.5 Avaliação da porção inorgânica do dente e periodonto por MEV e micro CT na maxila e no fêmur-----	77
6.6 Análise da imunomarcação para proteína OPG em células ósseas-----	83
7 DISCUSSÃO -----	85
8 CONCLUSÃO -----	96
REFERÊNCIAS -----	97
ANEXO -----	107

1 INTRODUÇÃO

A movimentação dentária induzida (MDI) é baseada na remodelação óssea de acordo com a aplicação de forças mecânicas, promovendo reações nos tecidos periodontais e o deslocamento dentário (GHONEIMA *et al.*, 2010). A biologia da movimentação dentária modifica-se por uma série de condicionantes, como a intensidade da força, tipo de movimento, período de observação, dentes envolvidos, morfologia radicular e da crista óssea e a influência de medicamentos (BARTZELA *et al.*, 2009; SUZUKI *et al.*, 2016)

Diferentes medicamentos são capazes de alterar a remodelação óssea interferindo na movimentação dentária. Dentre os fármacos estudados com finalidade de avaliar esta interação encontram-se: antiinflamatórios não esteroidais e esteroidais; hormônios, como estrógenos (DIRAVIDAMANI *et al.*, 2012) e recentemente os bisfosfonatos (BFs) (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

Os bisfosfonatos possuem alta afinidade pelos tecidos mineralizados e atuam em sítios de grande formação e reabsorção óssea, sendo bastante utilizados em desordens osteolíticas, como osteoporose, mieloma múltiplo, metástases de câncer de mama, pulmão (MARX *et al.*, 2005; LULLIS *et al.*, 2014). Na última década, relatos baseados em evidências científicas surgiram envolvendo um grupo de fármacos dos Bisfosfonatos com complicações nos ossos maxilares, como a osteonecrose, apontando como fator de risco procedimentos odontológicos como: cirurgias dentárias e periodontais (MARX, *et al.*, 2003), tratamentos endodônticos, periodontites, próteses mal adaptadas (RUGGIERO *et al.*, 2006), movimentação ortodôntica (ZAHROWSKI, 2007) e de forma espontânea.

Dentre os BFs com infusão sistêmica, envolvidos nas complicações, destacam-se o pamidronato (90 mg), de segunda geração, e zoledronato (4 mg), de terceira geração. O ácido zoledrônico é um dos principais BFs envolvidos no processo de osteonecrose dos maxilares (PELAZ, 2014).

Estudos que relacionam os BFs e ortodontia consiste na avaliação da ancoragem dentária e reabsorção radicular (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2015), porém não apresenta estudo experimental avaliando se a movimentação

dentária é um fator de risco para a osteonecrose, apresentam evidência clínica (RINCHUSE *et al.*, 2007) e revisão sistemática (KRIEGER *et al.*, 2013)

A escassez de estudos avaliando a relação da influência dos bisfosfonatos na movimentação ortodôntica é comum, e como não estar definido a etiopatogênese do envolvimento dos bisfosfonatos nos ossos maxilares é que este estudo propôs avaliar o efeito do ácido zoledrônico na movimentação dentária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metabolismo ósseo

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especial, rígido, altamente vascularizado e metabolicamente ativo (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015). A matriz óssea apresenta componentes orgânicos (35%) e inorgânicos (65%). A parte orgânica é constituída de fibras colágenas tipo I, proteoglicanas e proteínas não colagênicas (osteocalcina, osteopontina, osteonectina) (LU *et al.*, 2018).

A parte inorgânica é constituída de íons, como cálcio, fosfato, zinco, flúor, magnésio (FIELD *et al.*, 2000). A mineralização óssea é iniciada por pequenas vesículas matriciais extracelulares, secretadas por osteoblastos, induzindo a nucleação e o subsequente crescimento de cristais de fosfato de cálcio no seu interior (RATH *et al.*, 2000). Embora os íons cálcio sejam abundantes em todo o fluido tecidual próximo às vesículas da matriz, o influxo de íons fosfato em vesículas matriciais é um processo crítico mediado por várias enzimas e transportadores, como eto-nucleotídeo pirofosfatase / fosfodiesterase 1 e fosfatase alcalina não específica tecidual (HASEGAWA 2018).

Componentes celulares do tecido ósseo apresentam células de duas linhagens diferentes: Linhagem osteoblásticas (células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos), com origem embriológica mesenquimal; Linhagem osteoclástica (osteoclastos) origem embriológica hematopoiética, provenientes dos monócitos (BOISSY *et al.*, 2000).

Osteoblastos são células mesenquimais da medula óssea, de revestimento, na superfície óssea, com função de controle da concentração

plasmática de cálcio, sendo consideradas o sítio primário da troca de íons entre o sangue e o osso (YANG *et al.*, 2001). São células engajadas na síntese, glicosilação e secreção de proteínas, como fosfatase alcalina, osteocalcina, osteopontina e colágeno tipo I (ALPHY *et al.*, 2018).

A diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos ocorre com a participação da via Wnt/ β -catenina e fator transformador de crescimento β associada à proteína morfogenética óssea, estes induzem a expressão de RUNX2 contribuindo com o anabolismo ósseo (GAUR *et al.*, 2005; DATTA *et al.*, 2008).

Osteócitos são diferenciados dos osteoblastos por proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) e fator de crescimento transformante- β . São células altamente ramificadas com seu corpo celular nas lamelas (UDA *et al.*, 2017). Seus prolongamentos são responsáveis pela comunicação celular permitindo o controle da remodelação óssea por meio de detecção de cargas mecânicas (WU *et al.*, 2017).

Os osteócitos e os linfócitos T vêm sendo abordados recentemente na participação da osteoclastogênese (LI *et al.*, 2018). Wu *et al.* (2017) detectaram que os osteócitos poderiam promover a diferenciação osteoclástica e a formação de células multinucleadas positivas para TRAP após a estimulação com IL-6 e IL-6R. A presença desta citocina aumenta a diferenciação osteoclástica mediada por osteócitos ativando JAK2 e RANKL.

Novas evidências emergentes sugerem que a via Wnt/ β -catenina em osteócitos pode ser desencadeada por crosstalk com a via da prostaglandina em resposta ao carregamento que, em seguida, leva a uma diminuição na expressão de reguladores negativos como Sost e Dkk1 (BONEWALD e JONSHON, 2008). A identificação da esclerostina, proteína restrita a osteócitos, antagonista da via Wnt/ β -catenina, evidencia que os osteócitos exercem controle direto sobre a remodelação óssea (KRAUSE *et al.*, 2010).

Osteoclastos são células multinucleadas com média de 3 a 15 núcleos, apresenta na membrana plasmática receptor da calcitonina e fosfatase ácida resistente ao tártaro (TRAP), além de sintetizar e liberar catepsina K,

adenosina trifosfato, isozima anidrato carbônica II que auxiliam na função de degradação da matriz óssea, promovendo a reabsorção óssea (TEITELBAUM; ROSS, 2003).

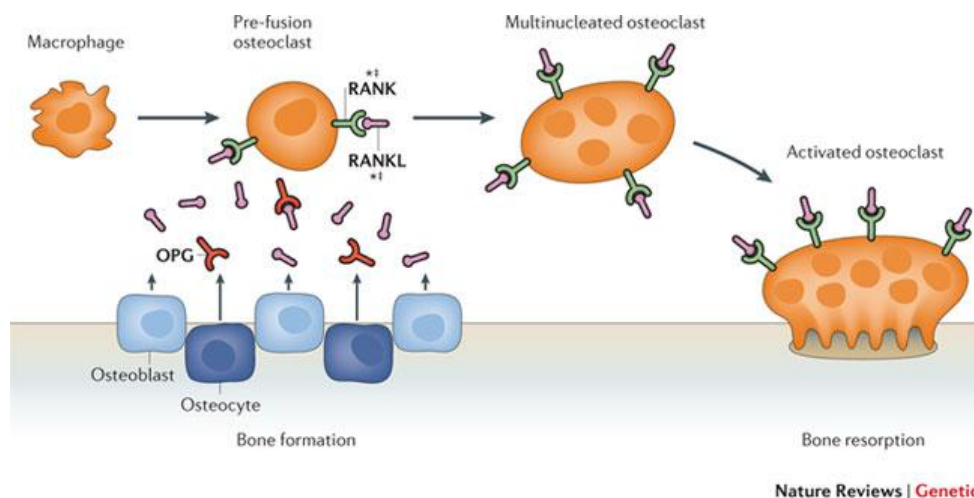
O metabolismo ósseo é regulado por osteoclastos, osteoblastos e osteócitos, este representa cerca de 95% de células do tecido ósseo e desempenham um papel importante na formação de osteoclastos e na regulação das atividades dos osteoblastos atuando como um fator chave de remodelação óssea (UDA *et al.*, 2017).

A remodelação óssea permite o movimento dentário, através de dispositivos ortodônticos, que ao aplicar uma força no centro do dente, ocorre uma distribuição do estresse mecânico para o periodonto, promovendo no lado de compressão uma reabsorção óssea e no lado de tração uma neoformação óssea (GHONEIMA *et al.*, 2010).

A reabsorção óssea é um processo com várias fases, iniciando com a proliferação de precursores de osteoclastos, advindos de monócitos, seguindo com sua diferenciação e maturação, sendo capaz de degradar matriz óssea (WU *et al.*, 2017). A presença de citocinas como a interleucina 1 β (IL- β), interleucina -6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α) e fatores de crescimento são essenciais para diferenciação e maturação de osteoclastos, contribuindo para a remodelação óssea (CAETANO-LOPES *et al.*, 2011).

Estes fatores atuam pela estimulação de células progenitoras de osteoclastos ou participando de uma sistema parácrino, com envolvimento de osteoblastos e células da medula óssea (LI *et al.*, 2015). O sistema parácrino é essencial para o metabolismo ósseo e seus mediadores incluem as moléculas RANK, RANKL e OPG (ARIFFIN *et al.*, 2011).

Figura 1. Expressão das proteínas RANK/RANKL/OPG nas células ósseas



Fonte: (BRENT RICHARDS; ZHENG; SPECTOR, 2012) **Legenda.** OPG é um competidor natural do RANKL para o receptor RANK, proteína transmembrana expressa nos pré-osteoclastos

RANK é uma proteína transmembrana, membro da família dos receptores TNF, expresso na superfície de células pré-osteoclásticas, linfócitos T, células dendríticas, facilitando a sinalização imunológica como pode visualizar esquematicamente na Figura 1 (ARIFFIN *et al.*, 2011).

RANKL é uma proteína solúvel, expressa por osteoblastos, células do estroma da medula óssea e células endoteliais, podendo sua expressão ser potencializada por fatores de reabsorção óssea como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e TNF α (CAETANO-LOPES *et al.*, 2011). É membro da superfamília do fator de necrose tumoral, sendo considerada a mais importante das citocinas envolvidas na reabsorção óssea (GRIMM *et al.*, 2015).

A principal função do RANKL é estimular a diferenciação de osteoclastos e inibir a apoptose. A expressão gênica desta proteína especifica a linhagem osteoclástica, incluindo genes que codificam a TRAP, catepsina K e o receptor para a calcitonina (TEITELBAUM; ROSS, 2003).

A OPG é uma glicoproteína solúvel que pertence à família TNF, secretada por osteoblastos (ALPHY *et al.*, 2018). A superexpressão de OPG bloqueia a maturação dos osteoclastos, podendo regular a reabsorção óssea e contribuiu para a manutenção da massa óssea (DOLCI *et al.*, 2017).

A razão RANKL/OPG é um parâmetro essencial para o controle da reabsorção óssea e densidade óssea mineral, uma vez que o OPG bloqueia a interação entre RANKL e RANK, diminuindo a ativação dos osteoclastos (NAKASHIMA *et al.* 2011).

A tríade molecular RANK/RANKL/OPG tem um papel importante na regulação da remodelação óssea, formando a via de sinalização osteoclastogênica, com regulação dos osteoblastos (WU *et al.*, 2017). A interação entre osteoclastos e osteoblastos são observados nesta via de sinalização, uma vez que o aumento do número de osteoclastos ativos e a reabsorção óssea dependem da presença do Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos (M-CSF) expresso pelos osteoblastos (ARIFFIN *et al.*, 2011).

As proteínas da matriz extracelular (MEC) do osso e da dentina são semelhantes, porém encontradas em concentrações diferentes entre as matrizes (SOARES *et al.*, 2007). Proteoglicanas, proteínas ácidas e colágeno tipo I constituem um arcabouço para a deposição de íons cálcio e fosfato na formação de hidroxiapatita. A osteopontina é mais predominante no tecido ósseo enquanto a sialoproteína é abundante na MEC da dentina (HUANG *et al.*, 2017).

A semelhança da morfologia e função das células do tecido ósseo e do dente, envolvem mecanismos de reabsorção radicular e ósseo parecidos, porém no dente, além do envolvimento da via osteoclastogênese, apresenta a via odontoclastogênese, via OPG/RANK/RANKL (SIRISOONTORN *et al.*, 2012). Desta forma, os medicamentos e outras substâncias como laserterapia que forem usadas para inibir a reabsorção óssea pode ajudar na reabsorção radicular durante o tratamento ortodôntico (JAWAD *et al.*, 2014).

2.2 Movimentação dentária induzida

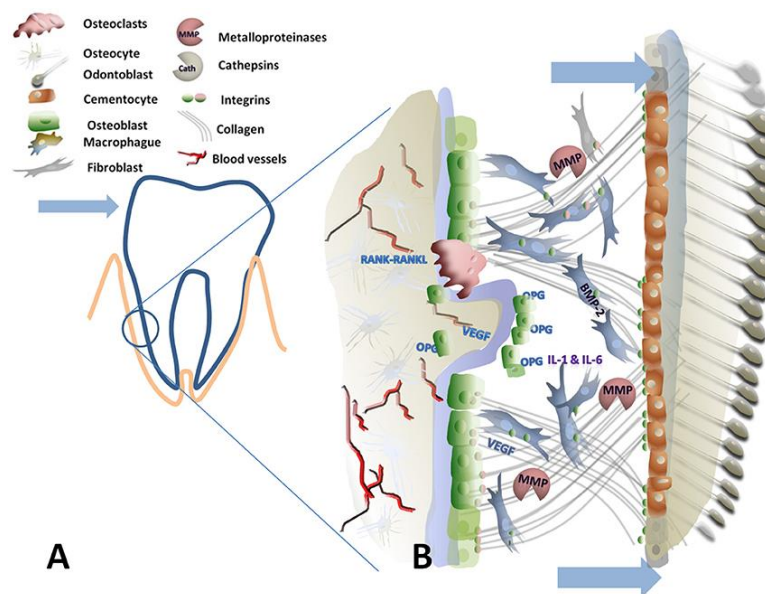
A movimentação dentária induzida (MDI) pode ser representada por um movimento ortodôntico, no qual o aparelho fixo é um dos dispositivos mais utilizados neste planejamento, com finalidade de correção de problemas estéticos e funcionais, nos níveis dentários e facial (FRANZONI *et al.*, 2017).

MDI é um deslocamento dentário fisiopatológico devido a aplicação da força, no qual promove reações nos tecidos periodontais de suporte: osso alveolar, ligamento periodontal, cemento e gengiva (FRACALLOSSI *et al.*, 2009). Em resposta às forças biomecânicas nestes tecidos ocorre um processo de remodelamento ósseo (GHONEIMA *et al.*, 2010).

A força ortodôntica aplicada envolve a produção de mediadores inflamatórios que atuam no ligamento periodontal (MEIKLE, *et al.*, 2005). Estresse mecânico leva deformação do ligamento periodontal, com alterações a níveis celulares, como diminuição da vascularização e do recrutamento dos leucócitos para os tecidos periodontais; e teciduais com o aparecimento de áreas de compressão e tração (TYROVOLA *et al.*, 2008).

O lado de tração da movimentação dentária induzida é representado por um estiramento do ligamento periodontal, com ativação do fluxo sanguíneo promovendo angiogênese e a neoformação do osso alveolar, devido ao aumento da atividade osteoblástica, as quais são induzidas por fatores de crescimento, como verifica-se na figura 2 (KIM *et al.*, 2007). Citocinas anti-inflamatórias exercem efeitos estimulatórios sobre os osteoblastos, interleucina -4 (IL-4) e interleucina -10 (IL-10) são expressas no ligamento periodontal, aumentando a expressão de OPG em osteoblastos, controlando a reabsorção e favorecendo a neoformação óssea (CHENG *et al.*, 2011).

Figura 2. Lado de tração do ligamento periodontal na movimentação dentária



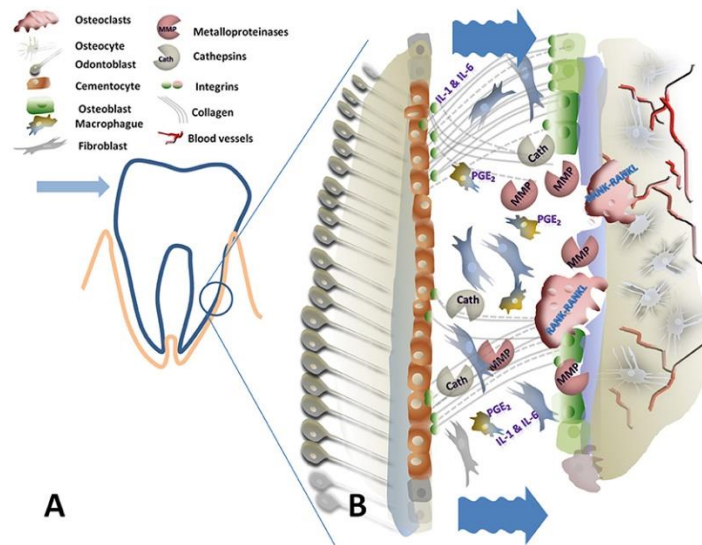
Fonte. (BARCIA *et al.*, 2017) **Legenda.** No lado de tração ocorrem proliferação de osteoblastos e síntese de colágeno, em que participam quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento. (A) Representação esquemática dentária na movimentação dentária, (B) Amplificação do lado de tração no ligamento periodontal.

No lado de compressão da movimentação dentária induzida é marcado pela mudança do fluxo sanguíneo, com colapamento dos vasos, que induz a hipóxia e o aparecimento de zonas de hialinização caracterizados por trombose e morte celular, verifica-se na figura 3 (HASHIMOTO *et al.*, 2013).

A matriz extracelular passa a ser composta por fibras colágenas densas, com ausência de células, denominadas áreas necróticas da matriz extracelular (CONSOLARO, 2007), estas liberam fatores quimiotáticos para células gigantes multinucleadas que se diferenciam em osteoclastos e promove a reabsorção óssea e a movimentação dentária propriamente dita (ALIKHANI *et al.*, 2015).

Os macrófagos ao fagocitarem as áreas necróticas hialinizadas, liberam quimiocinas e citocinas para atrair células mesenquimais (TYRAVOLLA *et al.*, 2010). Citocinas pró-inflamatórias, IL-1, IL-6, TNF- α ativam osteoclastos a reabsorver osso (JIANG *et al.*, 2015). IL-1 atua na suprarregulação das prostaglandinas e infraregulação de OPG e a IL-6 induzida por TNF- α estimula a reabsorção óssea por mecanismo de acoplar osteoclastos e osteoblastos (CHAE *et al.*, 2011).

Figura 3. Lado de compressão do ligamento periodontal na movimentação dentária



Fonte: (BARCIA et al., 2017) **Legenda.** No lado de compressão, a reabsorção óssea é regulada pela via RANK/RANKL/OPG, e estimulada por mediadores pró-inflamatórios. (A) Representação esquemática dentária na movimentação dentária, (B) Amplificação do lado de tração no ligamento periodontal.

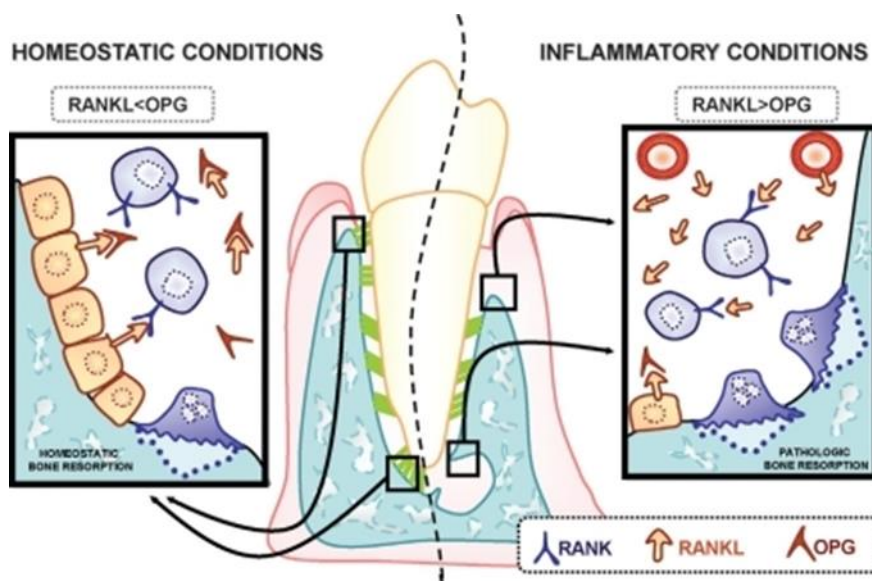
A MDI apresenta três fases de deslocamento dentário, apresentando uma curva dividida em fase inicial, latência e pós latência (FRACALOSSI et al., 2009). Na fase inicial, apresenta um rápido movimento dentário imediatamente após a aplicação da força, que está relacionada ao movimento do dente no espaço do ligamento periodontal; na fase latência ou “lag” é caracterizada por uma taxa baixa de deslocamento do dente ou nenhuma movimentação (GIBSON et al., 1992). Estudos sugerem que seja em decorrência da presença de áreas hialinizadas do ligamento periodontal (FRANZONI et al., 2017), que necessita ser completamente removido antes do início da próxima fase; e a última fase pós latência ou “pós-lag” representada pelo aumento da taxa de deslocamento dentário devido aos processos e aposição e reabsorção óssea (SUZUKI et al., 2016)

A intensidade da força interfere na biologia da movimentação dentária (LI et al., 2015), desta forma forças excessivas diminuem deslocamentos dentários, devido aumento de áreas hialinizadas, trombose celular e morte celular, além de promover a reabsorção radicular, com morte dos cementoblastos (ALIKHANI et al., 2015), em consequência da compressão dos

vasos sanguíneos do ligamento periodontal e ausência de oxigênio no local (CONSOLARO, 2005). Desta forma a determinação da força é de suma importância, uma vez que o excesso pode ser um fator crítico para a reabsorção radicular (TADDEI *et al.*, 2012).

Na movimentação dentária, o eixo RANK/RANKL/OPG é ativado promovendo a reabsorção óssea no lado de compressão do ligamento periodontal, levando a diminuição de matriz óssea, permitindo o deslocamento dentário (Figura 4) (LI *et al.*, 2015). Interação de medicamentos (BARTZELA *et al.*, 2009), força aplicada no dente, desordens metabólicas ósseas (ZAHROWSKI,2009) podem interferir nas vias de sinalização osteoclastogênica que participam da MDI, com desequilíbrio na homeostasia do osso e alteração no planejamento ortodôntico (SUZUKI *et al.*, 2016).

Figura 4. Eixo RANK/ RANKL/OPG na movimentação dentária



Fonte: (GRAVES *et al.*, 2011). **Legenda:** Aumento da expressão de RANKL no lado de compressão, e OPG no lado de tração.

Na movimentação ortodôntica, ao mesmo tempo que ocorre a reabsorção óssea, pode surgir outro fenômeno de reabsorção na raiz dentária (HUANG *et al.*, 2017). A força aplicada durante a movimentação dentária, gera uma redução de oxigênio e aumento de áreas hialínicas no ligamento periodontal (MATSUZAWA *et al.*, 2017), este fenômeno provoca a ativação dos

cementoclastos e morte celular dos cementoblastos, que são células localizadas na superfície dentária e protege a raiz de reabsorções indesejadas (NAJEEB *et al.*, 2017).

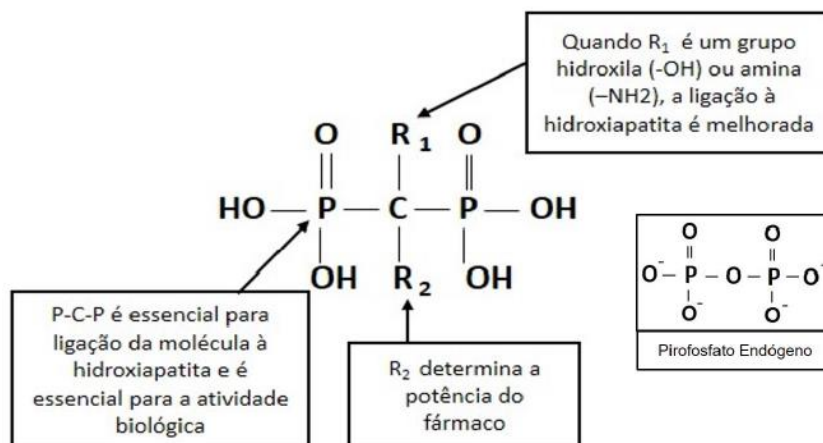
A reabsorção radicular em decorrência do tratamento ortodôntico é um evento indesejável e acomete cerca de 90% dos dentes permanentes e casos severos, em 10% (AN *et al.*, 2017). Alguns fatores de risco da reabsorção radicular, pode ser verificada como a morfologia radicular e da crista óssea, força aplicada durante a movimentação ortodôntica, idade, sexo, duração e tipo do tratamento ortodôntico (ARIFFIN *et al.*, 2011). O uso de fármacos (BRUNET *et al.*, 2016), laserterapia (SUZUKI *et al.*, 2016) e corticotomia (LIBRIZZI *et al.*, 2017) são algumas terapias utilizadas para controlar a reabsorção da raiz dentária.

2.3 Bisfosfonatos

Os bifosfonatos (BFs) são análogos dos pirofosfatos endógenos, com uma substituição de um átomo de oxigênio por um átomo de carbono (ROGERS *et al.*, 2000), sendo que os pirofosfatos são reguladores fisiológicos da calcificação e reabsorções ósseas, mas se tornam incapazes de inibir a calcificação “in vivo” quando administrados por via oral, devido à sua degradação no trato gastrointestinal (RODAN *et al.*, 1996; CASTRO *et al.*, 2004).

A modificação na estrutura química dos pirofosfatos, do átomo de oxigênio, pelo átomo de carbono, favoreceu a adição de duas ligações covalentes dando origem a compostos diferentes, com propriedades diferenciadas (ROGERS *et al.*, 2000). O grupo R1 determina a afinidade dos BFs pelos cristais ósseos, enquanto o grupo R2 é responsável pela potência e atividade farmacológica (FLEISCH, 1998) (Figura 5).

Figura 5. Estrutura química geral dos bisfosfonatos e do pirofosfato endógeno



Fonte. (SILVA, 2016)

Os BFs podem ser divididos em duas classes, os não-amino-BFs e os amino-BFs. Estes dois subgrupos diferem de acordo com a ausência (etidronato) e a presença (alendronato, zoledronato, risedronato) de nitrogênio nas suas cadeias laterais, o que modifica sua potência e seu mecanismo de ação (WOO *et al.*, 2006) Devido ao fato dos amino-BFs apresentarem uma potência aumentada em comparação aos não-amino-BFs, eles se tornaram medicamentos de escolha para a prevenção e tratamento de distúrbios ósseos com alta taxa de reabsorção (HARVEY *et al.*, 2007).

Os BFs possuem alta afinidade pelos tecidos mineralizados e atuam em sítios de grande formação e reabsorção óssea (ROGERS *et al.*, 2000)(SIRISOONTORN *et al.*, 2012). Em virtude destas características iniciou-se o estudo do emprego desses medicamentos no tratamento de patologias ósseas (HARVEY *et al.*, 2007). Sua administração pode ser por via oral ou intravenosa, sendo bem distribuído pelo plasma e, em parte (50%), absorvido pelo osso, sendo o restante excretado sem modificação pelos rins (DANNEMANN *et al.*, 2007).

Os BFs podem inibir a reabsorção óssea, favorecendo a utilização no tratamento de osteogênese imperfeita, osteoporose, displasia fibrosa, doença de Paget e, principalmente, nas metástases ósseas provenientes de complicações de neoplasias malignas (RUGGIERO *et al.*, 2004), aliviava dores e reduzia a atividade de lesões ósseas com atividade lítica e a ocorrência de

fraturas ósseas, levando a uma melhora na qualidade de vida dos pacientes (DANNEMAMN *et al.*, 2007).

Os bisfosfonatos possuem uma meia-vida longa óssea, média estimativa de 10 anos, tendo efeitos na remodelação óssea e reparação, possivelmente por um período de tempo estendido (KIMMEL *et al.*, 2007). São fármacos que atuam direta e indiretamente nos osteoblastos e osteoclastos resultando numa diminuição de turnover ósseo e exerce efeito inibidor nos mediadores inflamatórios afetando o processo de cicatrização de lesões ósseas (WAYAMA *et al.*, 2007)

Em nível celular há concordância geral que o alvo final da ação dos bisfosfonatos é o osteoclasto (BRUNET *et al.*, 2016). O aumento da osteocondutividade e osteoindução é verificado promovendo aumento da atividade osteoblástica (SIRISOONTORN *et al.*, 2012). In vitro, vários bisfosfonatos inibem a diferenciação dos osteoclastos oriundos da medula óssea (HUGHES *et al.*, 1989).

Evidências clínicas foram relatadas na literatura, há uma década (MARX *et al.*, 2003), e sugeriram que o uso prolongado dos BFs podia induzir o aparecimento da osteonecrose dos maxilares. No entanto, a American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS, 2007) definiu as três características necessárias para que essa lesão óssea seja associada aos bifosfonatos: paciente está sendo ou foi submetido à terapia dos bisfosfonatos; exposição necrótica óssea nos maxilares persistindo por mais de oito semanas e nenhuma história de irradiação sobre o sítio anatômico. Essa definição é importante na instituição de protocolos de atendimento e terapias da osteonecrose.

A classificação proposta pela AAOMS (2007) foi recentemente modificada em 2015, em que a osteonecrose dos maxilares por bisfosfonatos (OMB) passou a ser uma condição patológica de um grupo maior de osteonecrose dos maxilares associados ao uso de medicamentos (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A patogênese da osteonecrose induzida por bifosfonatos não apresenta um mecanismo esclarecido, no entanto a desordem do turnover ósseo, efeitos anti-angiogênicos e infecções são as hipóteses mais sugeridas na literatura (ALLEN, 2011). Fatores de risco inclui presença de trauma, como extração dentária; exposição à microrganismos da cavidade bucal e o uso prolongado do ácido zoledrônico, sendo relatados como osteonecrose espontânea (GANDER et al., 2014).

2.4 Ácido Zoledrônico e movimentação dentária

O Ácido Zoledrônico (AZ), é um bisfosfonato de terceira geração, portanto mais potente, com fixação mais intensa no osso, particularmente nas hidroxiapatitas (VASCONCELLOS *et al.*, 2004) . Este fármaco é administrado por via endovenosa em uma infusão de 4 mg por cerca de 15 minutos, e desaparecem rapidamente do plasma sanguíneo, sendo a metade capturada pelo osso e o restante excretado sem modificações pelos rins (LYSENG-WILLIAMSON, 2008).

O mecanismo de ação do AZ envolve a formação de um análogo da adenosina trifosfato osteoclástica, que induz a apoptose e a inibição da via do mevalonato na síntese de colesterol por inativação da farnesil difosfato sintase, com consequente desregulação do transporte intracelular, desorganização citoesquelética e inibição da proliferação osteoclástica (WOO *et al.*, 2006; GAO *et al.*, 2017).

É o fármaco mais comumente indicado nas osteoporoses severas, doença de Paget, mieloma múltiplo e metástases ósseas (HUJA *et al.*, 2011), tem efeito anti-tumoral (VASCONCELOS *et al.*, 2004) e antiangiogênico (FRANZONI *et al.*, 2017). AZ é o mais associado as complicações dos bisfosfonatos, com o surgimento da osteonecrose (SILVA *et al.*, 2015).

Recentemente tem sido relatada a existência de possíveis inter-relações entre o tratamento ortodôntico e a ocorrência de osteonecroses em pacientes que fazem uso dos bisfosfonatos por via intravenosa (RINCHUSE *et al.*, 2007). A interferência na movimentação dentária (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2016), dificuldade de fechar espaços dentários após exodontias com finalidade

ortodôntica (SEIFI *et al.*, 2017) e o risco de osteonecrose (ZAHROWSKI, 2009) são os possíveis danos do uso crônico deste fármaco.

É indubitável que a administração dos bisfosfonatos incorra em efeitos adversos ao tratamento ortodôntico, visto que a atividade osteoclástica é requisito substancial à remodelação óssea e, por conseguinte, ao movimento dentário (ARAUJO, 2013).

A captação dos BFs está intrinsicamente relacionada a taxa de remodelação óssea. Isto eleva, de duas a três vezes, a concentração do bisfosfonato no osso trabecular, local em que o *turnover* ósseo ocorre de maneira expressiva (LIN *et al.*, 1999). Por mecanismo similar, o movimento dentário ortodôntico resultaria em aumento de captação da droga no osso alveolar (ZAHROVSKI, 2007). Sucedendo, em potencialização dos seus efeitos e do risco de osteonecrose, complicação associada à administração desta classe de drogas.

O uso do AZ como ancoragem do dente molar na ortodontia é uma hipótese levantada, devido a inibição da reabsorção óssea no lado de pressão da força aplicada (VENKATARAMA, *et al.*, 2012). Ortega *et al.* (2012) indica a administração do AZ para promover a ancoragem máxima (ORTEGA *et al.*, 2012).

O controle através de fármacos da reabsorção radicular durante a movimentação dentária também vem sendo relatado com a administração do AZ (SIRISOONTORN *et al.*, 2012), devido a inibição da função das células clásticas através do controle da via RANK/RANKL/OPG, uma vez que o AZ pode suprimir a expressão de RANKL, que encontra-se elevada em reabsorção radicular grave (YAMAGUCHI *et al.*, 2006).

3 JUSTIFICATIVA

O ácido zoledrônico (AZ) é indicado para pacientes com distúrbios osteolíticos, como osteoporose avançada e mieloma múltiplo e, também, na prevenção/tratamento de metástases ósseas associadas ao câncer de mama e próstata (MARX *et al.*, 2005; RUGGIERO *et al.*, 2006). A relevância do presente estudo baseia-se no uso crescente desse fármaco devido ao aumento na expectativa de vida das populações e, conseqüentemente, na maior incidência das taxas de osteoporose e câncer (RUGGIERO *et al.*, 2009). Apesar disso, graças aos avanços da medicina, as pessoas estão vivendo mais e melhor, incluindo os portadores dessas doenças (KRIEGER *et al.*, 2013). O desenvolvimento de novos fármacos, como o AZ, tem contribuído consideravelmente para essa realidade.

A longevidade, associada à melhoria da qualidade de vida, resulta, portanto, na maior preocupação por parte das pessoas, especialmente mulheres na terceira idade, em manter a estética facial e corporal, o que inclui a estética dentária, especialmente no Brasil, onde a aparência jovem é muito valorizada. De fato, a procura de adultos por tratamento ortodôntico tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, o que requer estudos para investigar a resposta dos dentes e periodonto de adultos, especialmente adultos mais velhos, frente à força aplicada, sob condições normais e especiais, como é o caso de pacientes que fazem uso crônico de alguma medicação. Esses estudos tornam-se mais relevantes ainda no caso de fármacos que interferem com o metabolismo ósseo. Especificamente em pessoas que fazem uso de AZ, a preocupação maior está relacionada à ocorrência de osteonecrose dos maxilares, baseado em vários estudos da literatura sugerindo que procedimentos odontológicos em pacientes tratados com bisfosfonatos são fatores predisponentes para a ocorrência de necrose óssea nos maxilares (POELMANS *et al.*, 2012). Ademais, considerando que a biomecânica da movimentação ortodôntica envolve reabsorção e formação (remodelação) óssea, é fundamental investigar se um fármaco cujo mecanismo de ação envolve a inibição da reabsorção óssea, como é o caso do AZ, interfere com a taxa de movimentação dentária. Esses estudos são

determinantes para a indicação com segurança de tratamento ortodôntico à pacientes tratados com AZ.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento com ácido zoledrônico na movimentação dentária induzida e na microarquitetura do osso alveolar da maxila e de fêmur de ratos.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Estabelecer os períodos de observação ideais, utilizando um modelo experimental de movimentação dentária, para a investigação do efeito do ácido zoledrônico (AZ) no deslocamento dentário induzido.

- ✓ Avaliar o efeito do tratamento com AZ:
 - na avaliação do risco à osteonecrose da maxila por meio de análises macroscópicas e por microtomografia computadorizada
 - na taxa da movimentação dentária por meio de medições macroscópicas e microscópicas (histomorfometria), considerando os lados de compressão e tração.
 - sobre os dentes movimentados e seus tecidos periodontais associados, considerando parâmetros microscópicos, tais como áreas hialínicas do ligamento periodontal (áreas necróticas), presença de células clásticas, reabsorção óssea e reabsorção radicular, por meio de microscopia óptica e eletrônica de varredura.
 - sobre a porção mineral e orgânica do osso alveolar da maxila através de de microscopia confocal, microscopia eletrônica de varredura, microtomografia computadorizada (micro CT) e da análise de lâminas histológicas de tecido ósseo descalcificado.
 - sobre as fibras do ligamento periodontal através da análise de lâminas histológicas coradas com *picrosirius red* e *Mallory* e da análise da autofluorescência do colágeno através de microscopia confocal.

- sobre a vascularização do periodonto através da contagem do número de vasos e do cálculo da área dos vasos presentes no ligamento periodontal.
- na via RANK, RANKL E OPG no periodonto de sustentação dos dentes movimentados através da imunohistoquímica
- no osso femural dos ratos submetidos à movimentação ortodôntica, através da mensuração do osso cortical e do espaço medular por micro CT

5 MATERIAS E MÉTODOS

5.1 Desenho do estudo e aspectos éticos

É um estudo experimental, randomizado, controlado e cego, utilizando um modelo animal de movimentação dentária induzida (HELLEN E NANDA, 1979), com modificações, com retenção na porção cervical da coroa dos incisivos superiores e utilização de resinas fotopolimerizáveis. Os protocolos experimentais foram executados seguindo as recomendações apresentadas no ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) guidelines para uso de animais experimentais (KILKENNY et al., 2010). Os experimentos foram iniciados logo após aprovação na Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFC, protocolo nº 95/2015 (Anexo A), o qual é regido pela Declaração Universal de Direitos Animais (UNESCO – 27 de Janeiro 1978) e pelos Guias Éticos Internacionais para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (Conselho para Organizações Internacionais de Ciências Médicas – CIOMS).

5.2 Seleção de animais

Os protocolos experimentais foram executados de acordo com as diretrizes aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) para uso de animais experimentais. Foram utilizados 83 animais machos *Wistar*, com peso de 180-220 g, aproximadamente com 70 dias. Os animais foram mantidos sob condições de temperatura ambiente e ciclo claro-escuro natural durante os experimentos. Estes foram alojados em

gaiolas apropriadas, em número de cinco animais em cada uma delas, com alimentação balanceada à base de ração. A água e ração foram disponibilizadas à vontade. Após o período de adaptação de sete dias, iniciou-se o procedimento experimental.

Este estudo foi dividido em duas partes: (1) Definição no modelo experimental de movimentação ortodôntica em ratos, os períodos de observação ideais para a avaliação dos efeitos do ácido zoledrônico, baseando-se nas alterações macro e microscópicas, no dente e periodonto, induzidas pela movimentação dentária; (2) Avaliação do(s) efeito(s) do ácido zoledrônico nessas alterações.

5.3 Modelo movimentação dentária induzida

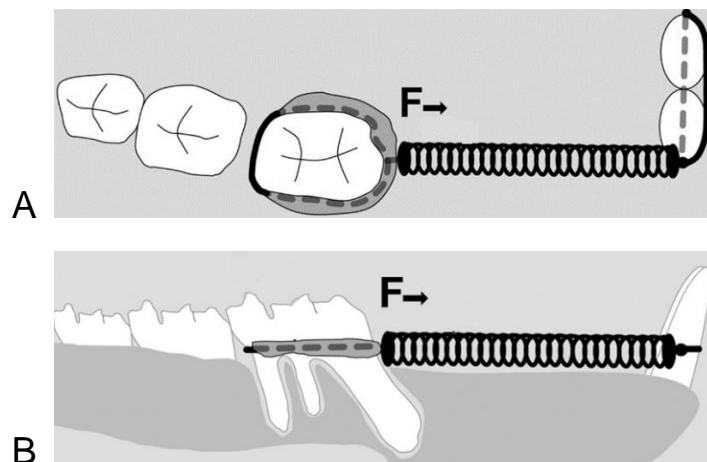
O dispositivo ortodôntico utilizado no presente estudo consiste em uma mola fechada para miniparafuso de níquel-titânio (NiTi) de 7mm de comprimento (Morelli®). Essa mola foi amarrada no primeiro molar superior esquerdo com fio de amarelo de 0,010 mm de diâmetro (Morelli®) utilizando uma força de 50gf sobre o primeiro molar superior esquerdo, medida e padronizada previamente/ com dinamômetro ortodôntico, de acordo com protocolo descrito na literatura (BRUNET *et al.*, 2016). Em seguida, a mola foi amarrada aos incisivos superiores com fio de amarelo de 0,010 mm de diâmetro (HASHIMOTO *et al.*, 2013) (Figura 6). Os incisivos e o fio de amarelo foram protegidos com resina (Fill Magic Ortodôntico com Flúor®, Vigodent). Após a ativação inicial, que consiste na aplicação de força, o aparelho não recebeu nenhuma outra ativação adicional durante o período experimental (ORTEGA *et al.*, 2012).

Para a instalação do fio de amarelo, com o auxílio de um abridor de boca, os animais foram previamente anestesiados com cloridrato de quetamina (60 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg). O fio foi inserido abaixo da ameia distal do primeiro molar superior direito e, com o auxílio de uma pinça Mathiew, foi trançado (posicionado) na região cervical ao redor do dente e fixado a uma das extremidades da mola (KURITA, 2017).

Os incisivos superiores, utilizados como ancoragem ortodôntica, foram desgastados e condicionados com ácido fosfórico a 37% (Alpha Acid®, DFL) por 15 segundos, para permitir a fixação com resina fotopolimerizável (Fill Magic Ortodôntico com Flúor®, Vigodent) do amarrilho às suas faces vestibulares, após a marcação da força de 50cN (ORTEGA *et al.*, 2012).

A aferição, no intuito de garantir a fidelidade da magnitude de força, foi marcado justo à face vestibular dos incisivos superiores, com o animal posicionado sobre a maca cirúrgica, horizontalmente, de forma que a linha de ação da força estivesse paralela ao solo (SIRISOONTORN *et al.*, 2012). A mola foi ativada com o auxílio de uma pinça Mathiew e verificado a magnitude de força: 50 gf com o auxílio de um dinamômetro de precisão (DUTRA, 2011).

Figura 6: Direção da força aplicada na movimentação dentária induzida, com mesialização do molar superior esquerdo e ancoragem nos dentes incisivos



Fonte. Adaptado (SIRISOONTORN *et al.*, 2012) **Legenda.** Primeiro molar superior esquerdo envolvido por um fio de amarrilho e mola de Niti e ancorado nos dentes incisivos superiores. Vista superior (A) e vista lateral (B).

5.4 Procedimentos de eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia por exsanguinação por punção cardíaca sob anestesia com quetamina 80mg/kg e xilazina 10 mg/kg, por via intraperitoneal em diferentes períodos de observação, conforme descrição abaixo.

5.5 Primeira fase do estudo: Estabelecimento do delineamento experimental

Nesta parte do estudo, que objetivou a determinação dos melhores períodos de avaliação, foram utilizados 35 ratos *Wistar (Rattus norvegicus)*. Os períodos de observação avaliados nessa primeira fase do estudo foram: 0, 1, 4, 7, 11, 14 e 21 dias após o início da movimentação dentária induzida, dias nos quais os animais foram eutanasiados e os parâmetros descritos a seguir foram avaliados: mensuração da movimentação dentária, análise histomorfométrica do ligamento periodontal e raiz dentária por microscopia, avaliando a compressão e distensão do ligamento periodontal (LP), áreas hialínicas no LP, quantificação de osteoclastos e reabsorção radicular.

5.6 Segunda Fase do Estudo: Avaliação do efeito do Ácido Zoledrônico (AZ) na movimentação dentária induzida e nas alterações dentárias e periodontais

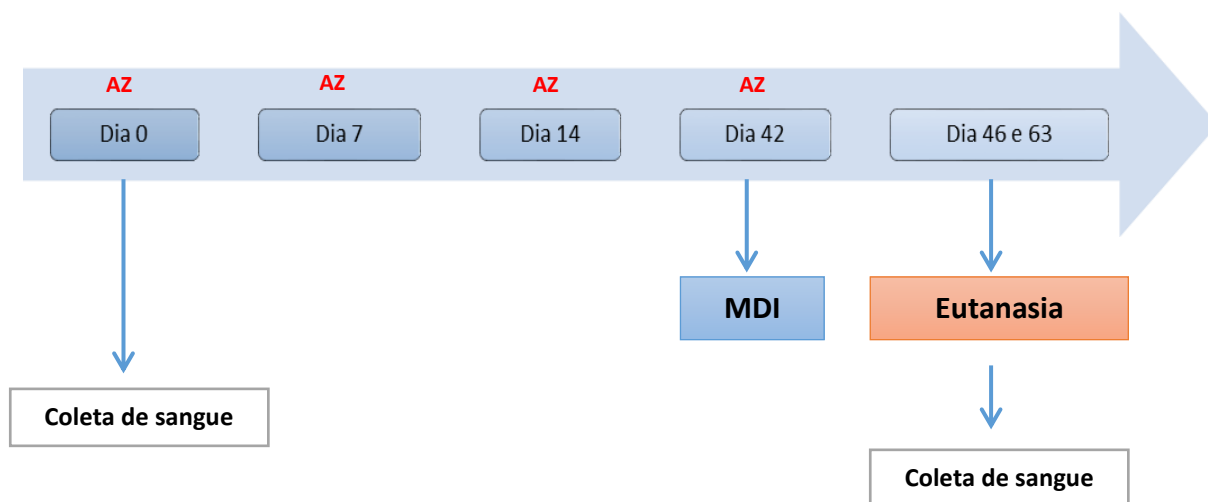
As concentrações de AZ foram selecionadas com base em estudos descritos na literatura (SILVA et al., 2015). Nessa segunda fase experimental, foram utilizados 48 ratos *Wistar (Rattus norvegicus)*, distribuídos nos seguintes grupos experimentais, com pelo menos 6 animais por grupo:

- animais que não sofreram nenhuma manipulação (NAIVE)
- animais submetidos à movimentação dentária que receberam solução salina, na concentração de 0,1 ml/kg, por via endovenosa através da veia peniana (SALINA)

- animais submetidos à movimentação dentária que receberam ácido zoledrônico (Eurofarma®), na concentração de 0,2 mg/kg, por via endovenosa através da veia peniana (AZ 0,2);
- animais submetidos à movimentação dentária que receberam ácido zoledrônico (Eurofarma®), na concentração de 1,0 mg/kg por via endovenosa através da veia peniana (AZ 1,0).

Animais anestesiados com quetamina (60 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg), por via intraperitoneal, receberam AZ (Eurofarma®) ou solução salina, durante três semanas consecutivas (Dias 0, 7, 14) e no 42º dia experimental (SILVA et al., 2015), quando o dispositivo ortodôntico foi instalado e a movimentação dentária foi iniciada, conforme descrito anteriormente (Figura 7).

Figura 7. Representação esquemática do desenho experimental da avaliação do AZ na movimentação dentária induzida



Fonte. Elaborado pelo autor (2018)

5.7 Parâmetros Avaliados

5.7.1 Mensuração da movimentação dentária

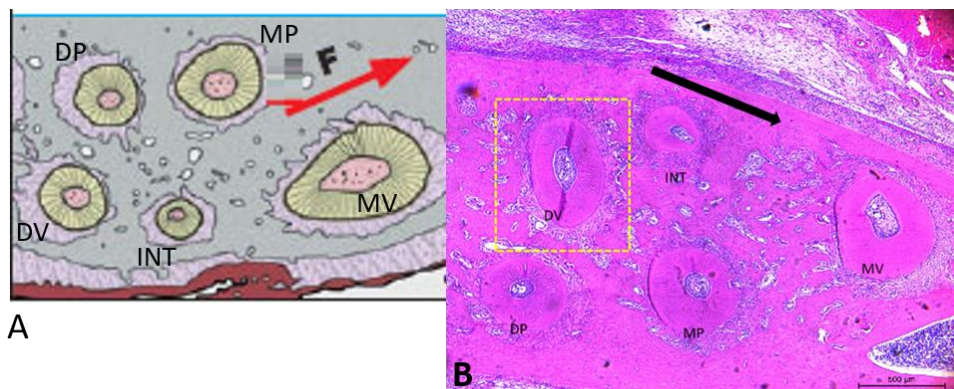
Após a eutanásia dos animais foram realizadas mensurações da movimentação dentária induzida (MDI), considerando os espaços entre os incisivos e os primeiros molares superiores, na hemiarcada desafiada (na qual foi instalada o aparelho ortodôntico) e na sua contralateral (sem aparelho), que foi utilizada como controle. Esta análise foi realizada nas duas fases do estudo. Tais medidas foram registadas no dia da colocação da mola, dia do início do deslocamento dentário (dia inicial - Di) e no dia da eutanásia (dia final - Df), com auxílio de um paquímetro digital. O deslocamento dentário, ou a quantificação da MDI, foi calculado a partir da seguinte fórmula (ARAÚJO, 2015):

$$MDI = \frac{(Di - Df) \text{ hemiarcada MDI} - (Di - Df) \text{ hemiarcada contralateral}}{Di \text{ hemiarcada contralateral}} \times 100\%$$

5.7.2 Avaliação histopatológica – avaliação da porção orgânica do dente e periodonto

Os animais foram sacrificados e tiveram suas maxilas removidas, separadas em duas hemiarcadas, dissecadas e fixadas com formol neutro a 10% por 24h, e descalcificadas com soluções de EDTA (10%, pH 7,4), renovadas a cada 48 horas, até a completa descalcificação do tecido (aproximadamente 2 meses). Finalizado o processo de descalcificação, as peças receberam processamento laboratorial de rotina para inclusão em parafina, possibilitando a obtenção de cortes histológicos (4 µm de espessura) do primeiro molar superior, evidenciando suas 5 raízes dentárias, cortadas transversalmente: mesiovestibular (MV), intermediária (INT), distovestibular (DV), mesiopalatino (MP) e distopalatino (DP) (Figura 8). Neste estudo utilizamos para as análises histomorfométricas a raiz distovestibular (DV), devido sua característica mais regular e por ser uma raiz estável, onde os fenômenos biológicos são verificados de forma mais intensa (FRACALLOSSI et al., 2009).

Figura 8. Fotomicrografia das 5 raízes (MV, INT, DV, MP E DP) do primeiro molar superior, em corte transversal.



Fonte. (A) Adaptado de Fracalossi (2009) e (B) elaborado pelo autor (2018). Legenda: as cinco raízes (MV, DV, INT, MP e DP) do primeiro molar superior; corte transversal. Linha tracejada destaca a raiz DV, eleita para as avaliações histomorfométricas. A seta indica a direção da força aplicada. Barra indica 500 µm, HE, 40x.

Os aspectos microscópicos da movimentação dentária induzida foram analisados no ligamento periodontal, no osso alveolar e na raiz distovestibular (DV) do primeiro molar superior (nos lados de tração e compressão), através de lâminas histológicas coradas pela hematoxilina-eosina (HE), *picro sirius red* (ScyTek®, Logan, UT, USA) e Mallory e submetidas à avaliação histológica com microscopia óptica convencional, confocal e luz polarizada. As lâminas coradas com *picro sirius* foram contra-coradas com hematoxilina de Harris. A avaliação microscópica empregada foi qualitativa e quantitativa, considerando os fenômenos teciduais e celulares decorrentes do movimento dentário induzido. Os seguintes parâmetros foram analisados:

- a. Distensão e compressão das fibras do ligamento periodontal
- b. Áreas hialínicas do ligamento periodontal (áreas de necrose)
- c. Quantificação de osteoclastos
- d. Reabsorção radicular
- e. Reabsorção do osso alveolar no lado de compressão
- f. Quantificação e diferenciação do colágeno no ligamento periodontal
- g. Presença e área dos vasos do ligamento periodontal

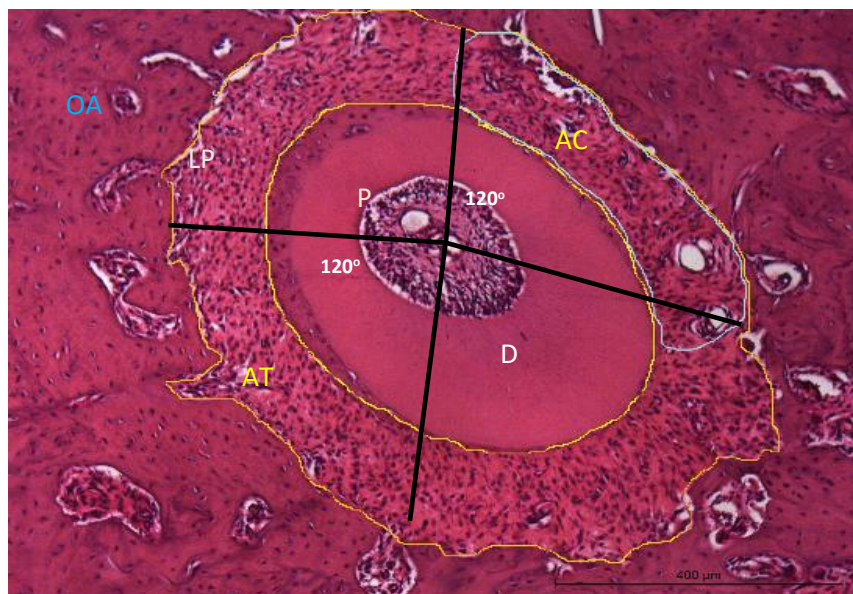
a. Distensão e compressão das fibras do ligamento periodontal

Para a mensuração das áreas de compressão (AC) e tração (AT) do ligamento periodontal da raiz DV, foi realizada, inicialmente, a delimitação da área total ocupada pelo LP. Para isso foram traçadas, com o auxílio do *software ImageJ®*, duas linhas correspondentes aos limites: 1. interno, interface LP e cimento, e 2. Externo, interface LP e trabeculado ósseo (Figura 9). A área situada entre essas duas linhas, ocupada pelo LP, foi calculada através da diferença entre estas duas medidas (linha externa – linha interna), conforme descrito anteriormente (DUTRA, 2011). Em seguida foram identificados os lados de compressão e tração e, para a delimitação e mensuração da área correspondente ao ligamento periodontal nesses respectivos locais, foram traçados dois ângulos de 120°, com auxílio do *software ImageJ®*. Os dois ângulos apresentam vértices comuns no centro da polpa, sendo um arco voltado para o lado de tração e o outro para o lado de compressão, de forma que as porções centrais desses dois locais (tração e compressão) estão situadas nas áreas cortadas pela bissetriz de cada respectivo ângulo, ou seja, no centro dos arcos (Figura 9). As áreas de compressão e tração foram calculadas e expressas em percentagem em relação a área total do ligamento periodontal, de acordo com as fórmulas previamente descritas na literatura (ARAÚJO, 2015).

$$AC = \frac{\text{Área de compressão}}{\text{Área total do LP}} \times 100\%$$

$$AT = \frac{\text{Área de tração}}{\text{Área total do LP}} \times 100\%$$

Figura 9: Fotomicrografia do corte transversal da raiz DV com a delimitação de ângulo de 120°, delimitando as áreas de compressão e tração.

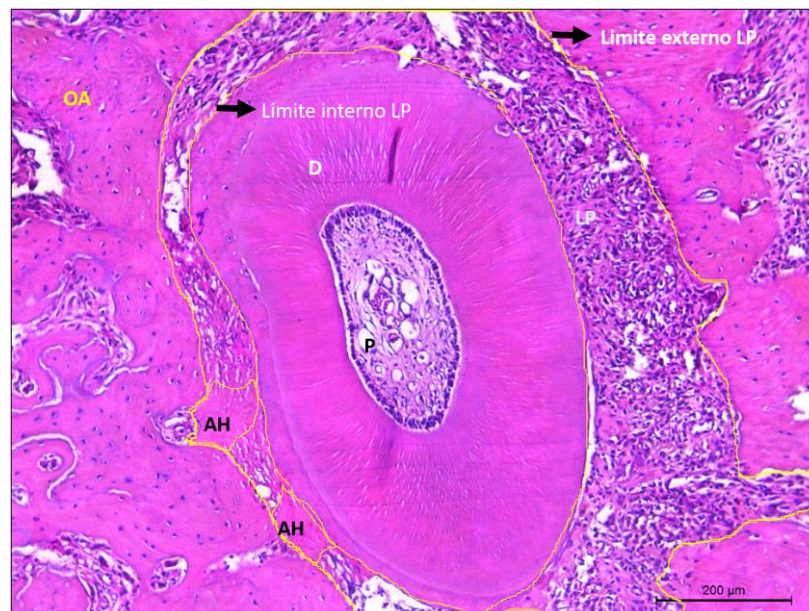


Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Delimitação das áreas de tração (AT) e compressão (AC) no ligamento periodontal (LP) da raiz distovestibular do primeiro molar superior, através do desenho de dois ângulos de 120°, cujos vértices localizam-se no centro da polpa (P). As porções centrais das AT e AC situam-se na região central dos seus respectivos arcos. D -dentina, AO- osso alveolar.

b. Áreas hialínicas do ligamento periodontal (áreas de necrose)

As áreas hialínicas, microscopicamente, são pobres em células e de aspecto eosinofílico homogêneo e fosco. Essas áreas foram delimitadas no ligamento periodontal da raiz DV (Figura 10) e mensuradas com auxílio do *software ImageJ®*. Em seguida, foi calculado o percentual de áreas hialinas em relação à área total do LP. Essa análise foi realizada nas duas fases experimentais do presente estudo.

Figura 10. Fotomicrografia do corte transversal da raiz DV com a delimitação de áreas hialínicas no LP



Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Delimitação das áreas hialínicas no LP da raiz DV, corte transversal. P-polpa, D-dentina, AO- osso alveolar, LP- ligamento periodontal, AH- áreas hialínicas.

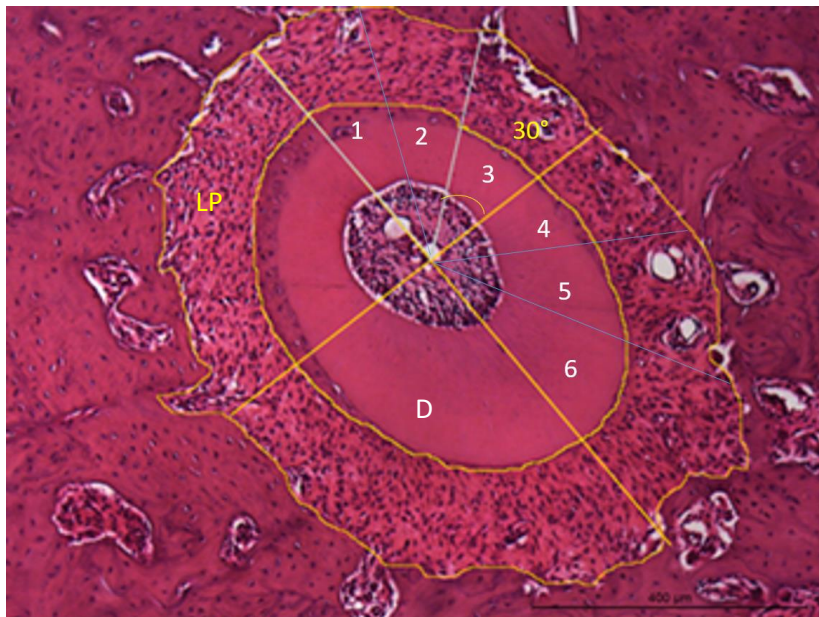
c. Quantificação de osteoclastos

As células multinucleadas (com pelo menos 3 núcleos) e localizadas na superfície óssea (SEIFI et al., 2017), denominadas osteoclastos, foram quantificadas no 4º dia experimental, ou seja, 4 dias após a instalação do aparelho ortodôntico. Na primeira fase experimental foram contabilizados todos os osteoclastos que margeavam as superfícies ósseas em contato com as cinco raízes do primeiro molar, enquanto na segunda fase foram quantificados os osteoclastos associados apenas à raiz DV.

d. Reabsorção Radicular

Para a avaliação da reabsorção de tecido dentário radicular (cimento e/ou dentina) no lado de compressão, foi traçada uma linha passando pelo centro da polpa da raiz DV com o auxílio do *software ImageJ®*, separando os lados de tração e compressão. O lado de compressão foi, então, dividido em 6 partes iguais, sendo cada parte correspondente a um ângulo de 30º (cujo vértice situa-se no centro na polpa) como ilustrado na figura 11. A reabsorção radicular na raiz DV foi avaliada de acordo com escores descritos na tabela 2, baseados no número de sextantes que apresentam focos de reabsorção radicular, metodologia previamente descrita no estudo de Kurita, com modificações (KURITA, 2017).

Figura 11. Fotomicrografia do corte transversal da raiz DV com a delimitação de ângulo de 30°



Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Delimitação seis áreas nos lados de compressão da raiz DV, através do estabelecimento de ângulos de 30°, para a avaliação da intensidade de reabsorção radicular.

Tabela 1. Escores referentes à reabsorção radicular no lado de compressão

ESCORES	GRAU DE EXTENSÃO DE REABSORÇÕES RADICULARES
0	RR ausente
1	RR abrange 30° da área delimitada
2	RR abrange 60° da área delimitada
3	RR abrange 90° da área delimitada
4	RR abrange 120° da área delimitada
5	RR abrange 150° da área delimitada
6	RR abrange 180° da área delimitada

Fonte. Adaptado de KURITA (2017)

e. Reabsorção do osso alveolar no lado de compressão

Na segunda fase experimental do presente estudo, a reabsorção óssea na superfície da cortical alveolar das áreas submetidas à pressão (área de compressão), que aparece frontalmente ao local de aplicação da força no ligamento periodontal (reabsorção óssea frontal ou direta) foi avaliada em microscópio confocal LSM 710 (Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha) utilizando o *software* do fabricante (Zen 2.1 lite black, 64-bit version, 758 MB, Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha). Lâminas de tecidos coletados 4 dias após o início da movimentação dentária, coradas com HE, foram utilizadas para esse fim, devido à autofluorescência do colágeno presente no ligamento periodontal, osso e dentina, em diferentes proporções. A matriz óssea do lado de compressão foi analisada a partir de imagens obtidas dessa área, na magnificação de 100x. O comprimento de onda de excitação foi de 488 nm (canal de emissão de fluorescência FITC-verde) (CARVALHO et al., 1999; ORIÁ et al., 2003; GONÇALVES et al., 2014; LIMA et al., 2017). As imagens foram processadas no programa *software ImageJ®* para a avaliação do percentual de reabsorção óssea, microscopicamente visualizadas como inúmeras lacunas na periferia da cortical óssea. Inicialmente, a área do osso alveolar do lado de compressão foi delimitada com auxílio do *software ImageJ®*, utilizando o comando de seleção de área livre (*Freehand selections > Clear Outside*). Em seguida, a área total do osso alveolar em cada amostra foi mensurada através do comando *Measure (Analyze > Measure)*. As imagens tiveram, então, suas cores invertidas a partir do comando *Invert (Edit > Invert)* e submetidas à calibração pelo comando *Color Thershold (Image > Adjust > Color Thershold)* na função RGB para as cores Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 35 e Máximo de 69) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 255). Depois da calibração, com destaque para tecido ósseo, as imagens foram convertidas para escala de cor de 8-bits (*Image > Type > 8-bit*), binarizadas (*Process > Binary > Make Binary*) para permitir a mensuração da área marcada em branco, correspondente ao tecido ósseo em cada amostra (*Analyze > Analyze Particles*) (FERREIRA JÚNIOR, 2016). Os resultados foram expressos como percentual de reabsorção óssea no lado de compressão, em relação ao volume total de osso nesta área (de compressão).

f. Análise quantitativa e qualitativa das fibras colágenas do ligamento periodontal

As fibras do ligamento periodontal nos lados de tração, distendidas devido à aplicação da força ortodôntica, foram avaliadas em lâminas de tecidos coletados 4 dias após o início da aplicação da força. Essas lâminas foram coradas com *picrosirius red*, coloração que permite uma análise qualitativa e quantitativa das fibras colágenas do tecido conjuntivo, diferenciando principalmente as fibras tipo I e tipo III, corando-as em vermelho. Essas fibras, quando visualizadas ao microscópio óptico com lente polarizada, assumem colorações distintas. Ficam alaranjadas - avermelhadas se forem fibras de colágeno tipo I, ou esverdeadas caso sejam de colágeno tipo III (JUNQUEIRA et al., 1979; MONTES & JUNQUEIRA 1991).

O percentual de fibras colágenas dos tipos I e III foi calculado em todos os grupos experimentais, a partir de fotomicrografias abrangendo o ligamento periodontal da raiz DV na área de tração, na magnificação de 100x. As imagens obtidas foram avaliadas pelo software ImageJ®, após calibração pelo comando Color Thershold (Image > Adjust > Color Thershold) na função RGB para as cores Vermelho (Mínimo de 71 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 69) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 92). Em seguida, as imagens foram convertidas para escala de cor de 8-bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary) para permitir o cálculo da área total do colágeno do ligamento periodontal, marcado em preto (Analyse > Analyse Particles). O mesmo protocolo foi realizado sob a luz polarizada, ajustando-se as cores na função RGB para: Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 255) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 32). As imagens foram convertidas para escala de cor de 8-bits (Image > Type > 8-bit) e binarizadas (Process > Binary > Make Binary) para a mensuração da porcentagem de colágeno tipo I. A área verde-esbranquiçada, representativa do colágeno tipo III, foi obtida através de processo semelhante ao descrito para a avaliação das fibras de colágeno I, alterando-se os canais de cores RGB para: Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 65), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 255) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 255) (ANDRADE et al., 2011; FERREIRA JÚNIOR, 2016). A média do percentual de colágeno total,

colágeno tipo I e colágeno tipo III nos respectivos ligamentos periodontais das áreas de tração de cada grupo analisado foi apresentada como uma unidade de amostra e os dados foram apresentadas como média percentual \pm E.P.M.

g. Quantificação dos vasos sanguíneos do ligamento periodontal e mensuração da área ocupada por esses vasos

A vascularização do ligamento periodontal foi avaliada nos diferentes grupos experimentais a partir de lâminas de tecidos coletados 4 dias após o início da aplicação da força, coradas com *Mallory*, corante utilizado comumente na identificação de fibras colágenas, que são evidenciadas em azul nessa coloração. As lâminas foram utilizadas no presente estudo para a avaliação dos vasos sanguíneos, considerando que as hemácias e as células endoteliais são fortemente marcadas em vermelho, o que facilita a identificação dos vasos sanguíneos (NARIMIYA *et al.*, 2017). Uma área de $6 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ (área quente por apresentar maior número de vasos sanguíneos) no lado de tração, local onde o ligamento periodontal apresenta-se mais espesso devido ao estiramento de suas fibras, foi selecionada em cada amostra para análise. O número de vasos e o percentual da área ocupada por esses vasos em relação à área total ($6 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) foram avaliados a partir de imagens obtidas na magnitude de 400x analisadas com o *software ImageJ®*. Os dados foram expressos como número de vasos e (%) área de vasos, respectivamente.

5.7.3 Avaliação da porção inorgânica do dente (dentina e cimento), osso maxilar e fêmur

A porção inorgânica dos tecidos dentários e periodontais relacionados à raiz disto vestibular do primeiro molar superior foi analisada a partir de amostras coletadas no 21º dia experimental, imediatamente após a eutanásia dos animais, por microtomografia computadorizada (Micro CT) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Amostras do osso femural também foram coletadas e preparadas para estudos utilizando micro CT. A avaliação das estruturas dentárias e ósseas foi qualitativa e/ou quantitativa, considerando os fenômenos das alterações na morfologia óssea e radicular decorrentes do: 1. movimento dentário induzido (MDI), avaliando, o efeito do AZ no osso alveolar,

em função da MDI, no osso maxilar, e 2. efeito do AZ no osso femural. Os seguintes parâmetros foram analisados:

- a. Reabsorção radicular por MEV
- b. Microarquitetura da porção inorgânica do osso maxilar, através da análise da quantidade de volume ósseo, espessura trabecular, número de trabéculas e separação entre as trabéculas no osso maxilar por micro CT
- c. Microarquitetura da porção inorgânica do osso femural: através do volume ósseo cortical e diâmetro do canal medular por micro CT

a. **Reabsorção radicular**

No 21º dia experimental, imediatamente após à eutanásia dos animais, o primeiro molar superior foi removido e fixado em solução de Karnovsky por pelo menos 6 horas, depois mantidos em um tampão Cacodilato. O dente foi, então, colocado em um *ependorf* e deixado no dessecador por 24h. Em seguida, foram montados em *stubs* para a realização da metalização com ouro em pó (Metalizador Quorum QT150ES, Quorum Technologies, Laughton, Inglaterra) para a análise por microscopia eletrônica por varredura (MEV inspect-50, FEI, Hillsboro, Oregon, USA) (MACIEL-OLIVEIRA et al., 2011). A microarquitetura de superfície da raiz mesiovestibular foi avaliada a partir de imagens obtidas na magnificação de 100 x e 600 x, a com intuito de analisar irregularidades de superfície e áreas com lacunas de reabsorção radicular (LU et al., 2014).

b. **Microarquitetura da porção inorgânica do osso maxilar: através da análise da quantidade de volume ósseo, espessura trabecular, número de trabéculas e separação entre as trabéculas no osso maxilar por micro CT**

Hemiarçadas coletadas no 21º dia experimental foram dissecadas e armazenadas em freezer -20°C. Estas amostras foram escaneadas utilizando o aparelho Skyscan 1172 (Bruker MicroCT, Kontich, Belgium) em alta resolução -

5 μm – com o auxílio de um aparelho emissor de raio-X e fonte de voltagem de 70 kV, amperagem de 142 μA , potência de 10 W em uma rotação de 180° ao redor do eixo vertical e um passo de rotação de 0,4°. As imagens originais foram reconstruídas e convertidas em imagens de Bitmap através do *software* nRecon (versão 1.5.23). As imagens foram alinhadas com o *software* de visualização morfométrica *Data Viewer* (Bruker MicroCT).

Para avaliação do osso alveolar no lado compressão, um retângulo de tamanho (200 μm largura x 400 μm espessura x 1400 μm altura) foram desenhados com o intuito de determinar os limites da avaliação do osso alveolar na raiz distovestibular. O retângulo foi posicionado paralelo ao ligamento periodontal e adjacente à parede frontal do osso alveolar, com intuito de mensurar as mudanças estruturais ocorridas no osso alveolar próximo ao ligamento periodontal, durante a movimentação dentária (SUZIKI et al, 2016). Os seguintes dados foram obtidos nos lados de tensão e compressão: fração de volume ósseo e volume total (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N) e separação entre as trabéculas (Tb.Sp). Esses dados foram quantificados no departamento de odontologia da Universidade Federal da Paraíba, com o auxílio do *software* CT *Analyser* (Version 1.15.4.0, Bruker MicroCT).

c. Microarquitetura da porção inorgânica do osso femural: através do volume ósseo cortical e diâmetro do canal medular por micro CT

Após a eutanásia, no 21º dia experimental, o fêmur direito dos animais foi removido, dissecado e cortados transversalmente no local de maior diâmetro da região proximal e central da diáfise. Os cortes (1 mm de espessura) foram colocados em hipoclorito de sódio 2% durante 10 horas, para retirada do tecido mole e posteriormente serem analisados por microtomografia computadorizada, avaliando o volume da cortical óssea e o diâmetro do canal medular (PEREIRA et al., 2007). Os parâmetros para a aquisição da imagem para o fêmur foram: rotation step:0,40; frame:3; pixel: 12,99; Filter: AI 0,5; Use 180°; Random movement=off (10) em médium câmara pixel. As imagens originais foram reconstruídas e convertidas em imagens de Bitmap através do

software nRecon (versão 1.5.23), utilizando os parâmetros: smoothing:1; ring artifacts: 1; beam- hardening: 20%, output: 0,002482- 0115806.

5.7.4 Análise da imunomarcção da proteína OPG em células ósseas

A imunohistoquímica para OPG, foi realizada utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU & RAINE, 1981). Os tecidos ósseos foram desidratados em álcool sendo, então, incluídas em parafina. Após este procedimento, foram feitos cortes seriados de 4 µm em micrótomo apropriado e colocados em lâminas de L-polilisina, apropriadas para a realização de imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0), e (9.0) sob aquecimento em banho-maria, por 30 minutos para a recuperação antigênica a 95°C. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (20 minutos). Em seguida foi feito bloqueio de proteína com BSA 5% por 20 minutos. Os cortes foram incubados overnight com anticorpo anti-coelho OPG diluído 1:200 (ABCAM, Cambridge, MA, USA). Após a lavagem em PBS, foi feita a incubação com secundário (de detecção) biotilado IgG de coelho diluído 1:400 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estreptoavidina peroxidase conjugada (complexo ABC Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3'diaminobenzidine-peróxido (DAB), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5% (DALCICO *et al.*, 2013; HSU & RAINE, 1981). As imagens da imunohistoquímica foram capturadas por meio de um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3,5 (LEICA DM 1000, Wetzlar, Alemanha). Para quantificar a área imunomarcada para OPG presentes nos tecidos, utilizou-se o programa Adobe Photoshop 8.0 para obter

a área total e a área imunomarcada. Em seguida, para mensurar a porcentagem (%) de área marcada, efetuou-se o seguinte cálculo: % da área imunomarcada= área imunomarca (pixels) x100 (Área total de pixels)

5.7 Análise Estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se os dados de cada variável analisada se apresentavam com distribuição normal (dados paramétricos) ou não (não paramétricos). Os valores de *outliers* foram retirados (quando ocorreram) por não representarem aqueles resultados aos quais o estudo tinha o objetivo de generalizar (p-valor >0.05 para o teste de Shapiro-Wilk).

Os dados paramétricos foram analisados através do teste *t* de Student, para a comparação da média entre dois grupos, e do teste de ANOVA *one-way*, para a comparação das médias em variáveis com mais de dois grupos. O pós-teste (*post-hoc*) para a ANOVA *one-way* foi definido a partir da análise da homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Caso houvesse homogeneidade de variâncias (p-valor $\geq 0,05$), foi definido como pós-teste para a ANOVA *one-way* o teste de Tukey. Caso não houvesse homogeneidade de variâncias entre os dados (p-valor <0,05), foi definido como pós-teste para a ANOVA *one-way* o teste de Games-Howell.

Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Manny-Whitney, para a comparação da média entre dois grupos, e pelo teste de Kruskal Wallis, seguido do pós-teste (*post-hoc*) de Dunn's.

As médias foram expressas média \pm erro padrão (EPM), com intervalo de confiança (CI) (máximo e mínimo) em cada variável analisada. O nível de significância estatística utilizado foi de $p < 0,05$ e todas as análises foram efetuadas com recurso do software SPSS para Windows (versão 20.0) e gráficos elaborados usando recursos do GraphPad Prism® versão 6.0.

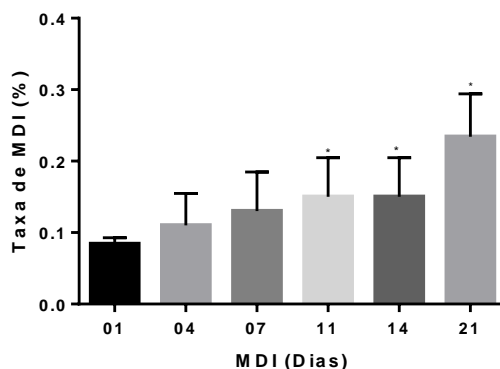
6 RESULTADOS

A primeira parte do presente estudo objetivou investigar: 1. a quantidade de movimentação dentária obtida em função do tempo (1,4,7,11,14 e 21 dias) de aplicação de uma força constante e 2. as alterações dentárias e periodontais durante a MDI, através da avaliação histopatológica da porção orgânica das raízes do primeiro molar superior e periodonto associado. Esses resultados encontram-se apresentados nos itens 6.1, 6.2.

6.1 Curva temporal da movimentação dentária

A movimentação dentária foi mensurada em diferentes dias de observação (1,4,7,11,14 e 21 dias). A figura 12 mostra que a instalação do dispositivo ortodôntico promoveu uma movimentação dentária a partir do 1º dia, de forma contínua, sendo o deslocamento dentário significativo apenas nos dias 11($p=0,035$), 14($p=0,035$) e 21($p<0,001$), em relação ao início da MDI, dia 0.

Figura 12. Representação gráfica da taxa de movimentação dentária nos dias (1,4,7,11,14 e 21)



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: A MDI foi realizada com a instalação de uma mola ortodôntica no primeiro molar superior esquerdo e ancorado no incisivo. As distâncias interproximais foram mensuradas nas duas hemimaxilas (submetida à MDI e a contralateral) e expressas como percentual de movimentação dentária. Barras representam média \pm EPM de 5 animais por grupo. (*) indica diferença quando comparado ao dia 0 (*kruskal-Wallis* test $p=0,001$ e *Dunn's* pos-hoc test).

6.2 Avaliação histopatológica da porção orgânica do dente e periodonto – primeira fase do estudo

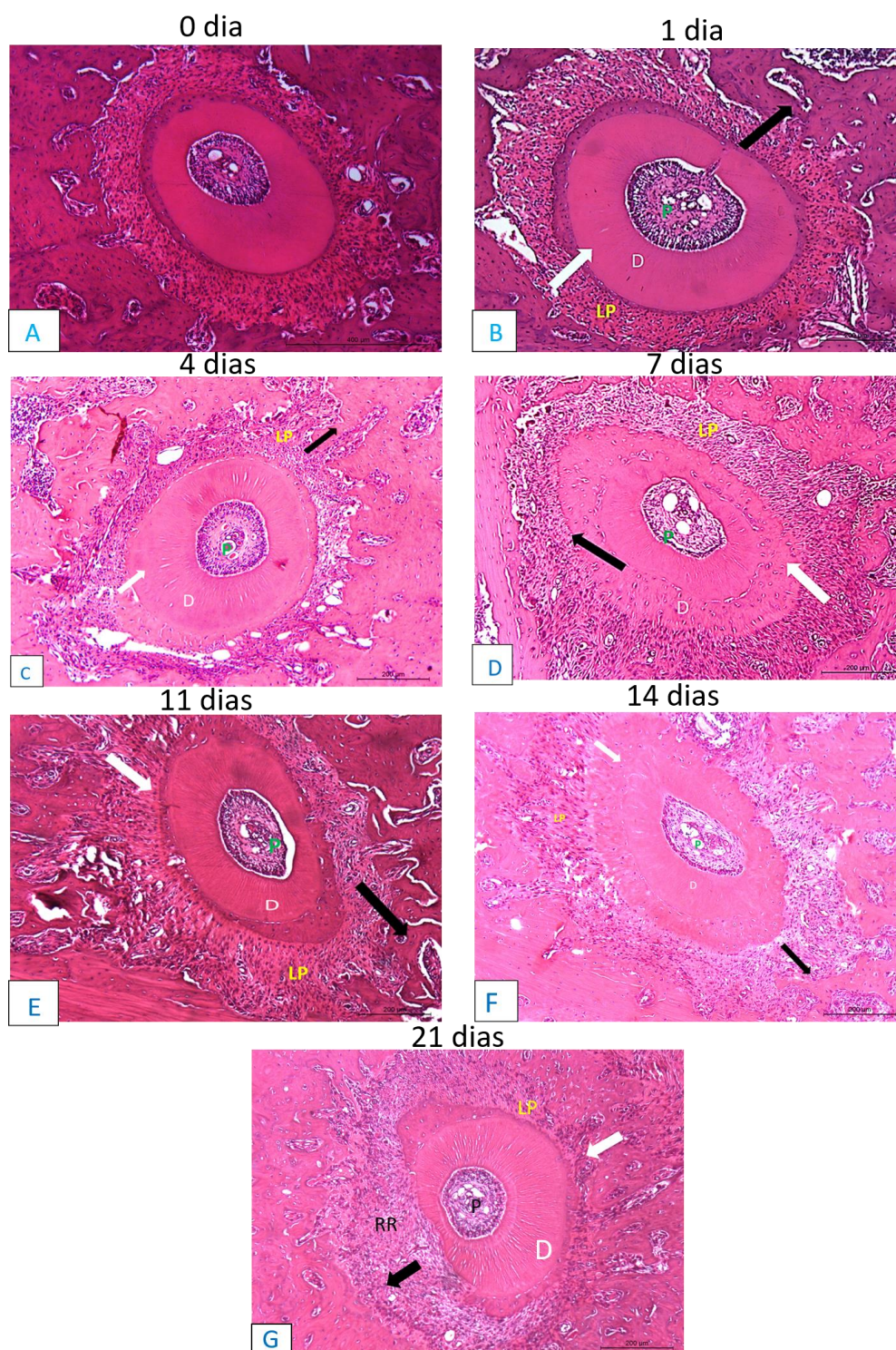
A análise microscópica das amostras mostrou mudanças teciduais no ligamento periodontal, osso alveolar e tecido dentário (cimento e dentina) no lado de compressão e tração quando submetidos à força ortodôntica, observadas a partir do 1º dia (Figura 13 A). No 4º dia da MDI, foi evidenciado uma redução do espaço do ligamento periodontal no lado de compressão, com presença de áreas extensas de necrose no LP quando comparado ao início do deslocamento dentário (dia 0) ($p < 0,001$) e aos dados coletados 1 dia após o início da MDI, dia 1 ($p = 0,021$) (Figura 15). As áreas hialínicas é caracterizada por diminuição do número de células, em consequência da hipóxia tecidual

No lado de tração, no 4º dia da MDI mostra um aumento do LP ($p = 0,011$) (Figura 14 A), devido a presença de fibras colágenas estiradas, paralelas e inseridas em sua maioria perpendicular ao osso alveolar e à camada de cimento, sendo caracterizada por um aumento em números dos vasos sanguíneos, com aparência levemente comprimidos e com grande extravasamento de hemácias. Cementoblastos e osteoblastos estavam justapostos à superfície dentária e óssea respectivamente (Figura 13 B).

Analisando a área de osso alveolar foi observado no dia 4 grande quantidade de número de osteoclastos e presença de reabsorção frontal (Figura 13 B). No 7º dia MDI, um aumento de células clásticas é significativo ($p = 0,003$) (Figura 16) e de áreas hialínicas no LP em relação ao início do movimento dentário ($p = 0,029$) (Figura 15).

No lado de compressão, os dias de MDI 11 ($p = 0,009$) e 21 ($p = 0,002$), foi observado uma redução das fibras de forma significativa relacionada com o início do deslocamento dentário (Figura 14 B). No lado de tração, LP começa a ser reorganizado a partir do 14º dia (Figura 13 E) e no dia 21 da MDI, em busca do restabelecimento da sua largura inicial. O 21º dia é caracterizado por uma reabsorção radicular externa no lado de compressão, nos tecidos da dentina e cimento (Figura 13 F).

Figura 13. Fotomicrografia de cortes transversais da raiz distovestibular em diferentes dias da MDI

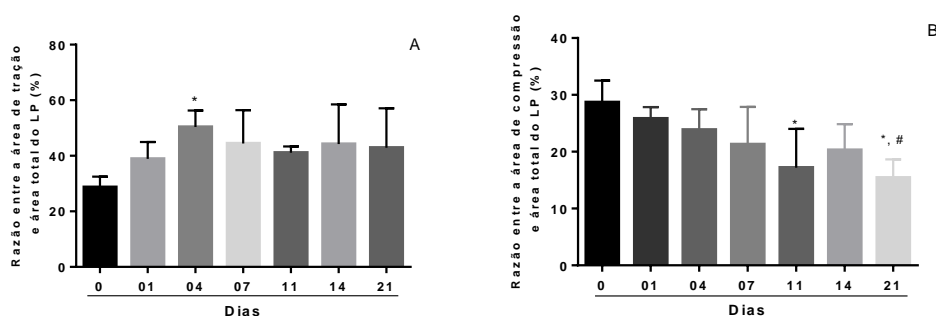


Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Aspecto de raízes submetidas a MDI com força de 50 cN nos dias 1, 4, 7, 11, 14 e 21. A seta preta indica direção da força no lado de compressão e a seta branca no lado de tração. As barras indicam 200 μm, coloração HE, 100x de magnitude.

a. Distensão e compressão das fibras do LP

Os gráficos da figura 14 quantificam as alterações do ligamento periodontal nos lados de compressão e tração nos diferentes dias de observação da MDI. O estiramento das fibras que constituem o LP do lado de tração mostra um aumento significativo no 4º dia da MDI quando comparado ao início da movimentação dentária ($p=0,011$). No lado de compressão a partir do primeiro dia de deslocamento dentário observa uma alteração no LP, sendo a redução significativa nos dias 11 ($p=0,009$) e 21 ($p=0,002$) quando comparado ao dia 0.

Figura 14. Análise histomorfométrica da raiz DV no lado de tração e compressão do ligamento periodontal

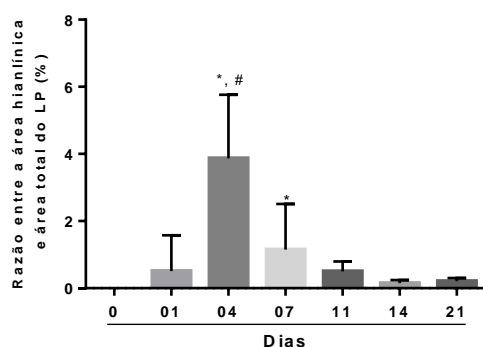


Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Histomorfometria da área de ligamento periodontal tração (A)/compressão (B) em relação à área total do LP. Barras representam média \pm EPM de 5 animais por grupo. No lado de tração (*) indica diferença quando comparado ao dia 0 (*kruskal-Wallis* test $p=0,041$ e *Dunn's* pos-hoc test). No lado de compressão (*) indica diferença quando comparado ao dia 0 e (#) quando comparado ao dia 1 (ANOVA $p=0,001$, Levene $p=0,223$ e Tukey pos-hoc test).

b. Áreas hialínicas do LP

O deslocamento dentário induzido por força ortodôntica resultou no aumento de áreas hialínicas do LP, como o esperado no lado de compressão, caracterizadas por áreas pobres em células e com aspecto eosinofílico nos dias 4 ($p < 0,001$) e 7 ($p = 0,029$) da MDI, quando comparado ao início da movimentação (Figura 15).

Figura 15. Análise histomorfométrica da raiz DV das áreas hialínicas do ligamento periodontal.

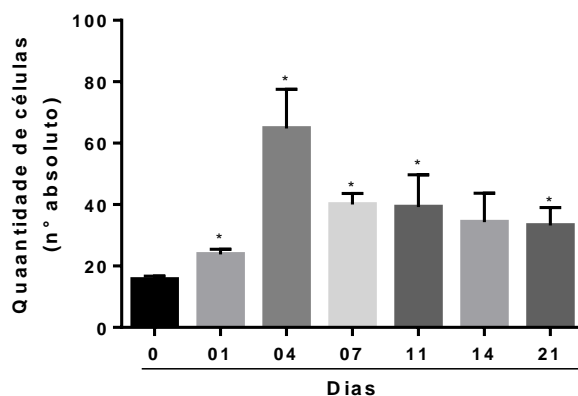


Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Histomorfometria de áreas hialínicas do lado de compressão em relação a área total do LP. Barras representam média \pm EPM de 5 animais por grupo. (*) indica diferença significativa quando comparado ao dia 0 e (#) quando comparado ao dia 1 (*kruskal- Wallis test* $p < 0,000$ e *Dunn's pos-hoc test*).

c. Quantificação de osteoclastos

A movimentação dentária induzida resultou no aumento do número de osteoclastos a partir do primeiro dia do deslocamento dentário ($p=0,004$) e obtendo a maior taxa de células clásticas no 4º dia da MDI ($p=0,007$), quando comparado ao início da força ortodôntica, que como o esperado apresentam células osteoclásticas correspondente a homeostasia do metabolismo ósseo (Figura 16).

Figura 16. Análise do número de osteoclastos no osso alveolar do primeiro molar superior



Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Média dos valores obtidos do número de osteoclastos em todas as raízes do PMS. Barras representam média \pm EPM de 5 animais por grupo. (*) indica diferença quando comparado ao dia 0 (ANOVA $p<0,001$, Levene $p=0,008$ e Games-Howell pos-hoc test).

d. Reabsorção radicular

Foi observado que a força ortodôntica resultou no efeito indesejável de reabsorção radicular a partir do 4º dia da MDI, mostrando resultados significativos no dia 21 ($p=0,001$) quando comparado ao 1º dia do deslocamento dentário, que como o esperado não apresentou nenhuma reabsorção radicular externa (Tabela 2).

Tabela 2. Análise da reabsorção radicular da raiz DV em diferentes dias da MDI

Avaliação da Reabsorção Radicular		
Dias	Scores (Mediana / Máximo- Mínimo)	p-valor
1	0 (0 - 0)	A
4	0.5 (0 - 1)	B
7	1 (0 - 2)	C
11	2 (1 - 3)	-
14	2.5 (2 - 3)	-
21	6 (6 - 6)	a,b,c

Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda. Quantificação dos escores da RR em diferentes dias da MDI. a: Associação entre os dias 1 e 21 - $p=0.001$, b: Associação entre os dias 4 e 21 - $p=0.002$, c: Associação entre os dias 7 e 21 - $p=0.037$. Teste de Kruskal-Wallis seguido de pos-hoc teste de Dunn`s.

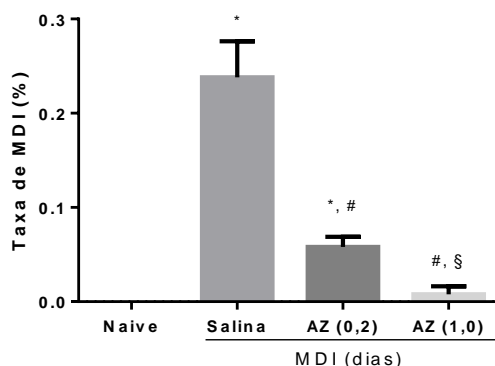
Os resultados a seguir, correspondem a segunda fase do experimento que avalia o efeito do AZ na mensuração da movimentação dentária, na avaliação histopatológica da porção orgânica das estruturas dentárias e ósseas, bem como avaliação por micro CT e MEV da porção inorgânica do dente, osso maxilar e fêmur.

6.3 Mensuração da movimentação dentária

Baseado nos dados coletados na primeira fase experimental, o dia 21 foi selecionado para verificar o efeito do AZ na movimentação dentária induzida. Foi observado que a força ortodôntica resultou em maior deslocamento dentário no grupo salina quando comparado ao grupo que não foi submetido a MDI ($p=0,001$). O tratamento com ácido zoledrônico interferiu na MDI, uma vez que reduziu o deslocamento dentário nos grupos AZ (0,2) ($p=0,001$) e AZ (1,0) ($p<0,001$) quando comparado ao salina (Figura 17).

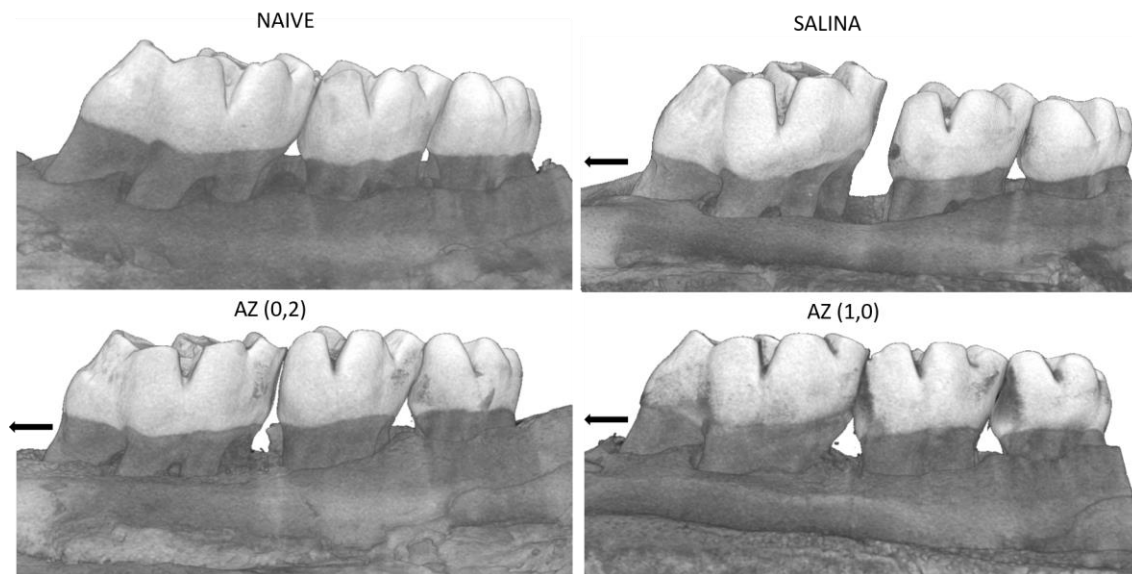
Na análise macroscópica e por microtomografia computadorizada nenhum grupo apresentou sinal clínico de necrose óssea. Na figura 18 é observado por imagens do micro CT, o maior deslocamento dentário com a movimentação dentária no grupo salina e a redução da MDI nos grupos tratados com AZ.

Figura 17. Taxa da movimentação dentária no período de 21 dias com a administração do AZ



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018). Legenda: Efeito do ácido zoledrônico na MDI com 21 dias de deslocamento dentário nos grupos experimentais. Barras representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. (*) indica diferença quando comparado ao grupo naive (#) indica diferença quando comparado ao grupo salina. (§) indica diferença quando comparado ao grupo AZ (0,2) (ANOVA $p<0,001$, Levene $p=0,001$ e Games - Howell *post-hoc* test).

Figura 18. Análise das imagens obtidas por micro CT do efeito do AZ com 21 dias da MDI



Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Análise macroscópica por microtomografia computadorizada do efeito do AZ na MDI no período de 21 dias. A seta preta indica direção da força de compressão.

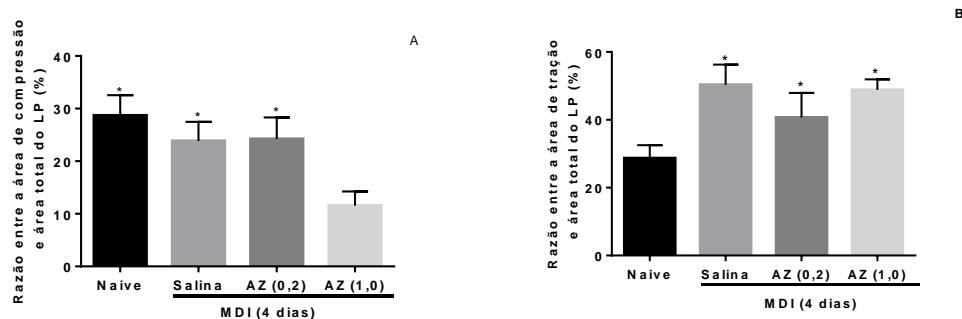
6.4 Avaliação histopatológica - porção orgânica do dente e periodonto

a. Compressão e distensão do ligamento periodontal

A movimentação dentária resulta no lado de compressão na direção da força aplicada e um lado de tração, na direção oposta. No grupo salina, que teve a aplicação da força ortodôntica não foi observado alteração do lado de compressão em relação ao grupo naive (Figura 19-A). O tratamento com AZ (1,0) apresenta uma redução significativa do LP em relação ao grupo naive ($p < 0,000$), salina ($p = 0,001$) e AZ (0,2) ($p = 0,001$) (Figura 19-A, Figura 20).

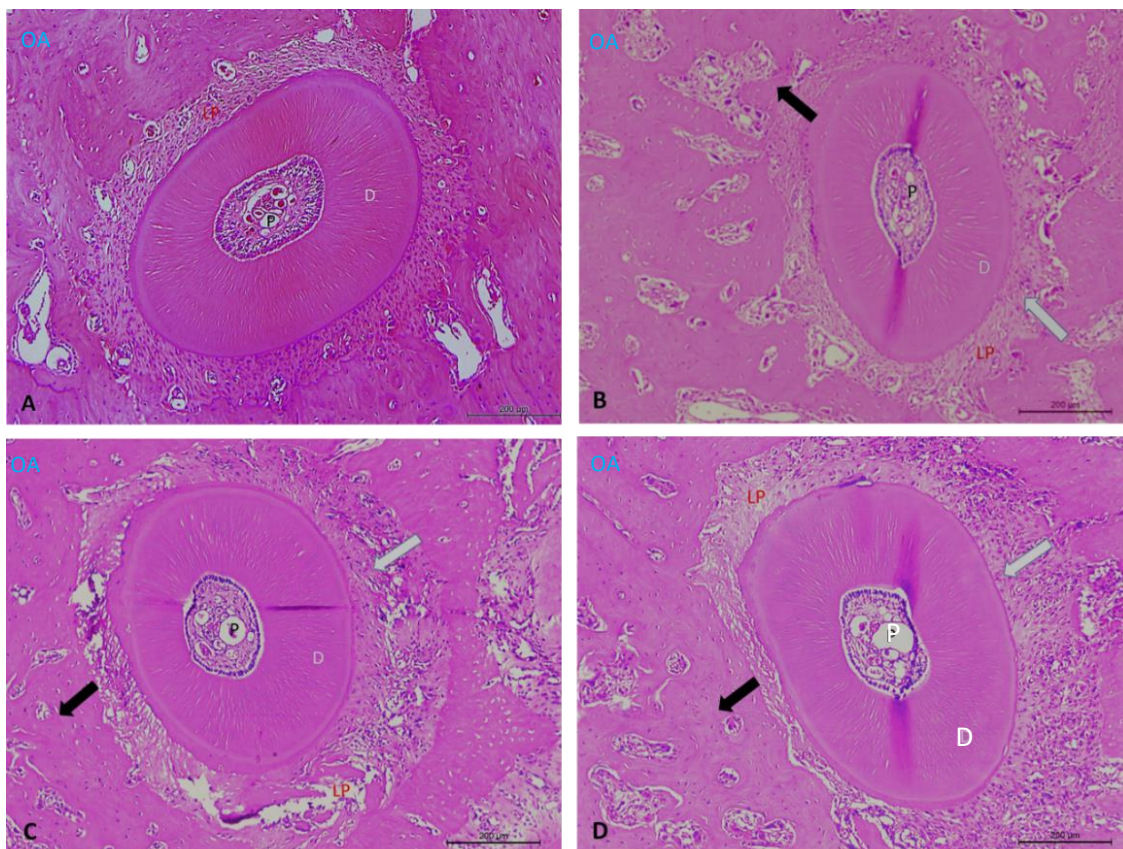
Na análise do lado de tração, nos grupos com movimentação dentária induzida foi observado um aumento significativo do LP nos grupos salina ($p < 0,000$); AZ (0,2) ($p = 0,015$) e AZ (1,0) ($p < 0,000$) quando comparado ao naive (Figura 19-B, Figura 20).

Figura 19. Análise histopatológica do efeito do AZ na distensão e compressão do ligamento periodontal.



Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Análise histopatológica do efeito do AZ na distensão e compressão do LP. Lado de Compressão (A)/Tração (B) em relação à área total do LP. Barras representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. (*) indica diferença quando comparado ao grupo AZ (1,0) na figura (A) (ANOVA $p < 0,000$, Levene $p = 0,782$ e *Tukey pos-hoc test*). (*) indica diferença quando comparado ao grupo naive na figura (B) (ANOVA $p < 0,000$, Levene $p = 0,218$ e *Tukey pos-hoc test*).

Figura 20. Fotomicrografia de cortes transversais da raiz distovestibular para análise da distensão e compressão do LP nos grupos experimentais Naive, Salina, AZ (0,2) e AZ (1,0)

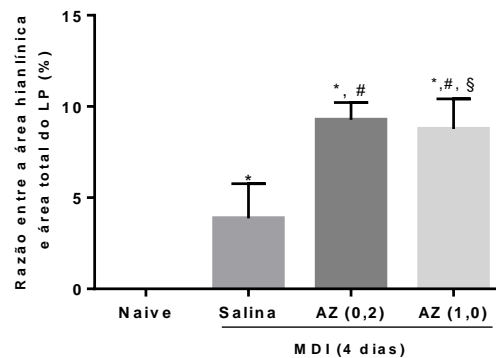


Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Histomorfometria do ligamento periodontal para análise dos lados de compressão, tração e áreas hialínicas nos grupos experimentais (A) Naive, (B) salina, (C) AZ (0,2) e (D) AZ (1,0). A seta preta indica direção da força no lado de compressão e a seta branca no lado de tração, P (polpa), D (dentina) LP (ligamento periodontal). As barras indicam 200 µm, coloração HE, 100x de magnitude.

b. Áreas hialínicas do ligamento periodontal (áreas de necrose)

Na quantificação das áreas hialínicas observa-se um aumento significativo de áreas necróticas do ligamento periodontal dos grupos que tiveram a aplicação da força ortodôntica: salina ($p=0,034$); AZ (0,2) ($p<0,001$) e AZ (1,0) ($p<0,001$) no lado de compressão quando comparado ao grupo naive. O tratamento com AZ eleva significativamente estas áreas de necroses do LP quando comparado ao grupo salina ($p=0,005$) (Figura 21).

Figura 21. Análise histopatológica do efeito do AZ na quantidade de áreas hialínicas do LP nos grupos experimentais Naive, Salina, AZ (0,2) e AZ (1,0)

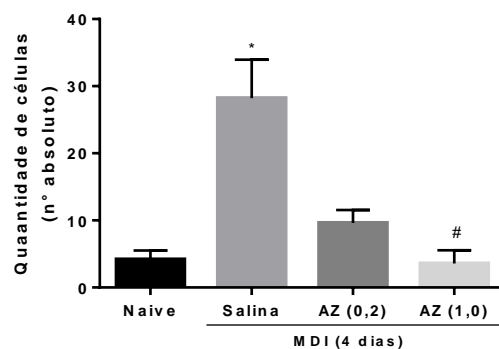


Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Análise histopatológica do efeito do AZ na histomorfometria da área de ligamento periodontal com análises da AH em relação à área total do LP. Barras representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. (*) indica diferença quando comparado ao grupo Naive. (#) indica diferença quando comparado ao grupo Salina. (§) Indica diferença quando comparado ao grupo AZ (0,2) (ANOVA $p<0,001$, Levene $p=0,043$ e *Tukey pos-hoc* test).

c. Quantificação de osteoclastos

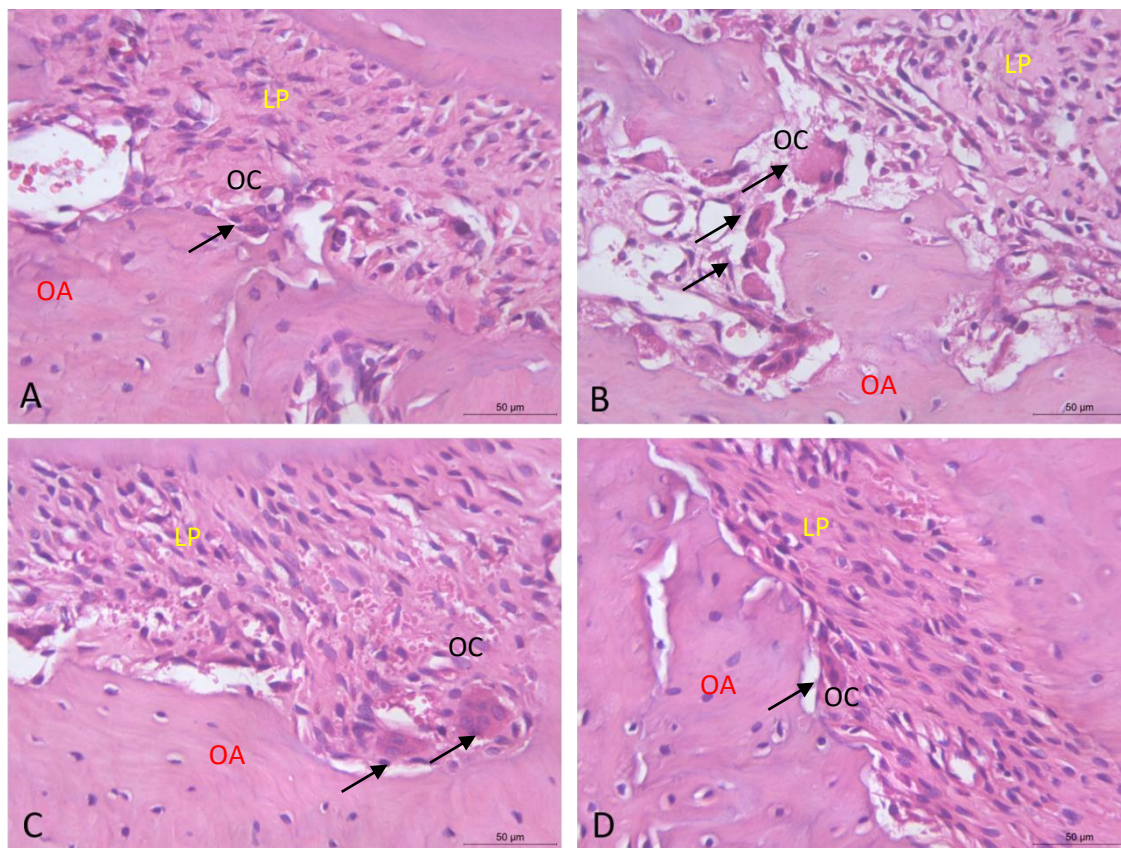
Foi observado que a aplicação da força ortodôntica resulta no aumento do número de osteoclastos do grupo salina ($p=0,008$) quando comparado ao naive. O tratamento com AZ (1,0) reduziu as células clásticas significativamente quando comparado ao grupo salina ($p=0,003$) (Figura 22, Figura 23).

Figura 22. Análise histopatológica do efeito do AZ na quantificação dos osteoclastos



Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Análise do efeito do AZ na quantidade de células osteoclasticas do osso alveolar nos grupos experimentais. Barras representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. (*) indica diferença quando comparado ao grupo naive, (#) indica diferença quando comparado ao grupo salina (*kuskal-Wallis* test $p=0,001$ e *Dunn's pos-hoc* test).

Figura 23. Fotomicrografia de cortes transversais da raiz distovestibular para análise da quantificação dos osteoclastos nos grupos experimentais Naive, Salina, AZ (0,2) e AZ (1,0).



Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Células osteoclásticas na matriz óssea do osso alveolar na raiz DV nos grupos experimentais (A) Naive, (B) salina, (C) AZ (0,2) e (D) AZ (1,0). (OA) – osso alveolar, (LP) – ligamento periodontal, (OC) – osteoclastos. A seta preta indica as células osteoclásticas. As barras indicam 50 μm, coloração HE, 400x de magnitude.

d. Reabsorção Radicular

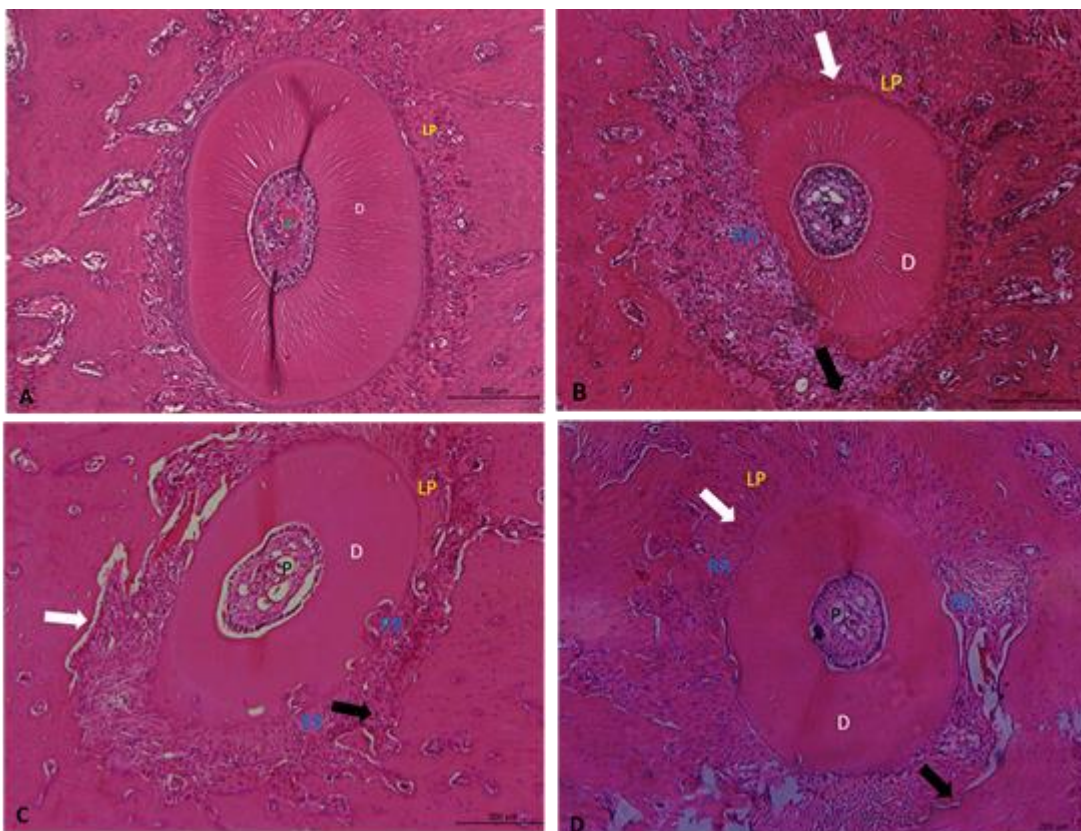
A movimentação dentária, no 21º dia, altera a superfície radicular com a presença de reabsorção do tecido dentinário e cimento (Tabela 3), como foi observado nos grupos que tiveram a aplicação da força ortodôntica, salina ($p < 0,001$) e AZ (0,2) ($p = 0,015$) quando comparado ao Naive (Figura 24). O grupo tratado com AZ de maior concentração reduziu a reabsorção radicular (RR) quando comparado ao grupo salina ($p = 0,015$).

Tabela 3. Análise da reabsorção radicular da raiz DV nos grupos experimentais Naive, Salina, AZ (0,2) e AZ (1,0)

GRAU DE EXTENSÃO DE REABSORÇÕES RADICULARES		
Dias	Scores (Mediana / Máximo- Mínimo)	p-valor
Naive	0 (0 - 0)	a, b
Salina	6 (6 - 6)	a
AZ (0,2)	3,5 (3 - 4)	b
AZ (1,0)	2 (2 - 2)	c

Fonte. (Autor, 2018) Legenda. Análise histopatológica do efeito do AZ na reabsorção radicular, expresso em escores. Valor em negrito significativo se $p < 0,05$. (^a) Associação entre os grupos Naive versus Salina - $p < 0,000$. (^b) Associação entre os grupos Naive versus AZ (0,2) - $p = 0,015$. (^c) Associação entre os grupos Salina versus AZ (1,0) - $p = 0,015$ (Teste de Kruskal-Wallis seguido de pos-hoc teste de *Dunn's*).

Figura 24. Fotomicrografia com corte transversal da raiz DV para análise do efeito do AZ na reabsorção radicular no período de 21 dias da MDI

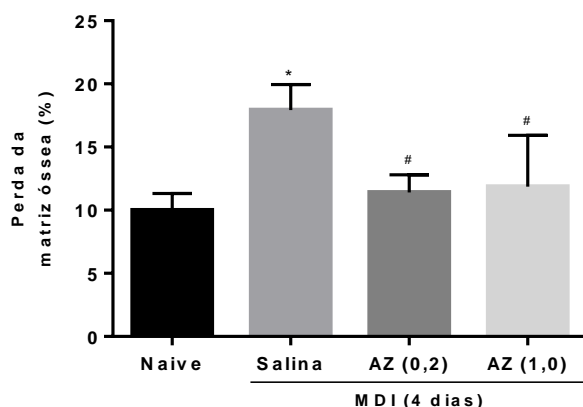


Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Análise da reabsorção radicular na raiz DV nos grupos experimentais (A) Naive, (B) salina, (C) AZ (0,2) e (D) AZ (1,0). A seta preta indica direção da força no lado de compressão e a seta branca no lado de tração. (RR) – reabsorção radicular, (LP) – ligamento periodontal, (P) – polpa, (D) - dentina. As barras indicam 200 μ m, coloração HE, 100x de magnitude.

e. Reabsorção do osso alveolar no lado de compressão

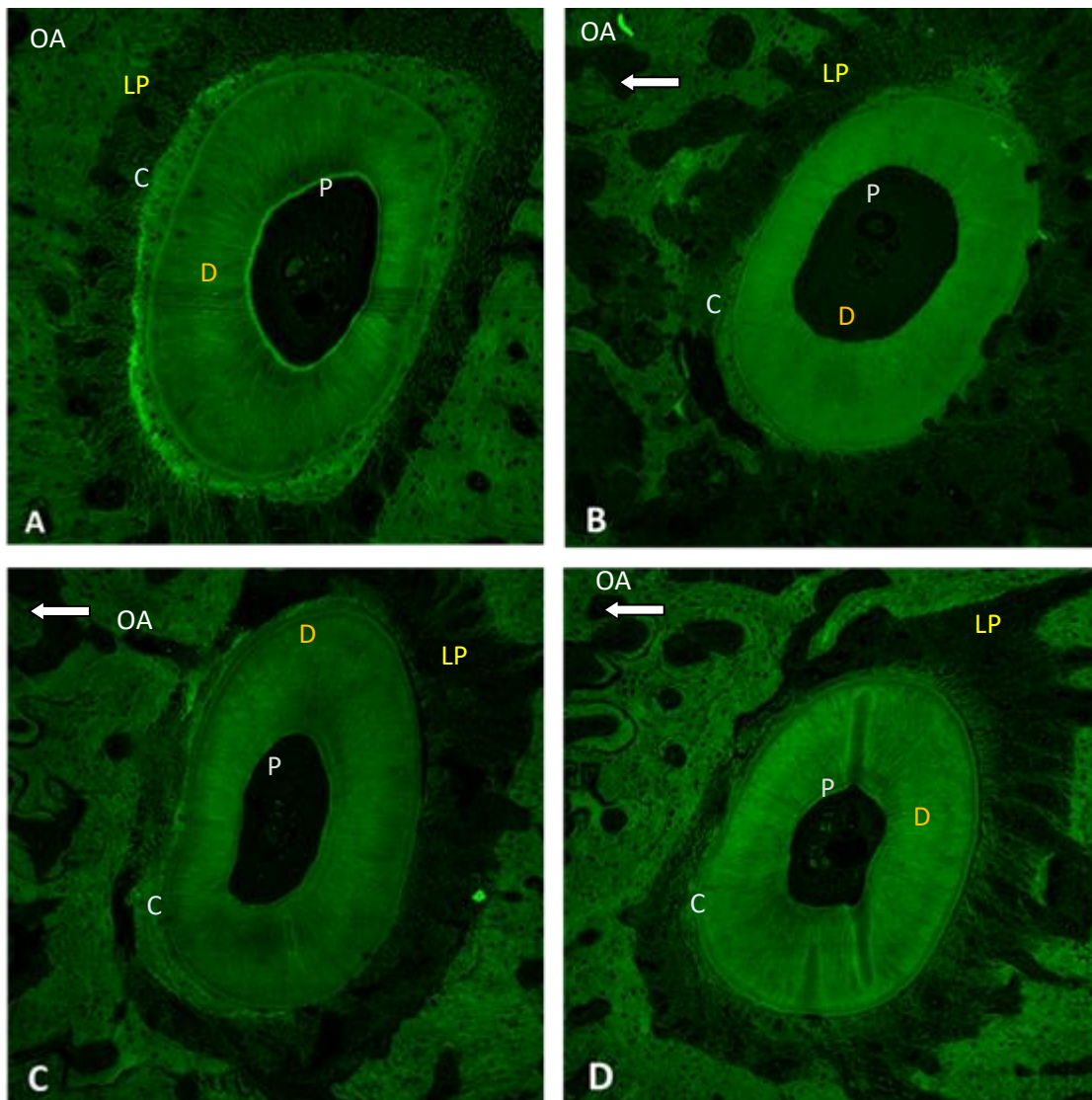
A matriz óssea alveolar do lado de compressão foi avaliada por microscopia confocal, analisando sua perda óssea. A força ortodôntica resultou na maior perda óssea no grupo salina quando comparado ao grupo que não foi submetido a MDI ($p=0,018$). A ação antirreabsortiva do ácido zoledrônico foi observado nesta análise, quando se verifica redução da perda da matriz óssea alveolar do grupo tratado com AZ (0,2) ($p=0,048$) e AZ (1,0) ($p=0,011$) quando comparado ao grupo salina (Figura 25, Figura 26).

Figura 25. Análise histopatológica do efeito do AZ na quantidade percentual da perda óssea alveolar do lado de compressão



Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Análise dos níveis de perda na matriz óssea alveolar nos grupos experimentais com efeito do AZ. Barras representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. (*) indica diferença quando comparado ao grupo naive. (#) indica diferença quando comparado ao grupo salina (ANOVA $p=0,019$, Levene $p=0,103$ e *Tukey pos-hoc* test).

Figura 26. Fotomicrografia do corte transversal da raiz DV analisada por microscopia confocal em diferentes grupos experimentais

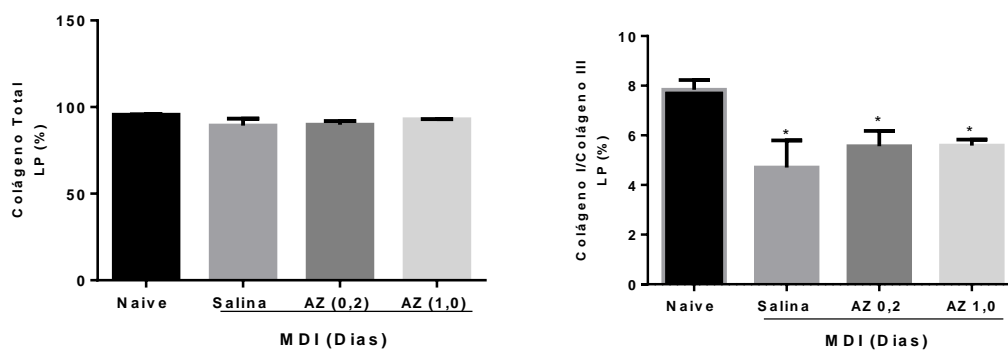


Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Análise histopatológica da reabsorção do osso alveolar no lado de compressão por microscopia confocal da raiz DV nos grupos experimentais (A) Naive, (B) salina, (C) AZ (0,2) e (D) AZ (1,0). (OA) – osso alveolar, (LP) – ligamento periodontal, (P) – polpa, (D) – dentina, (C) – cimento, Seta branca- indica direção de força ortodôntica. Confocal, 100x de magnitude.

f. Quantificação e diferenciação do colágeno no ligamento periodontal

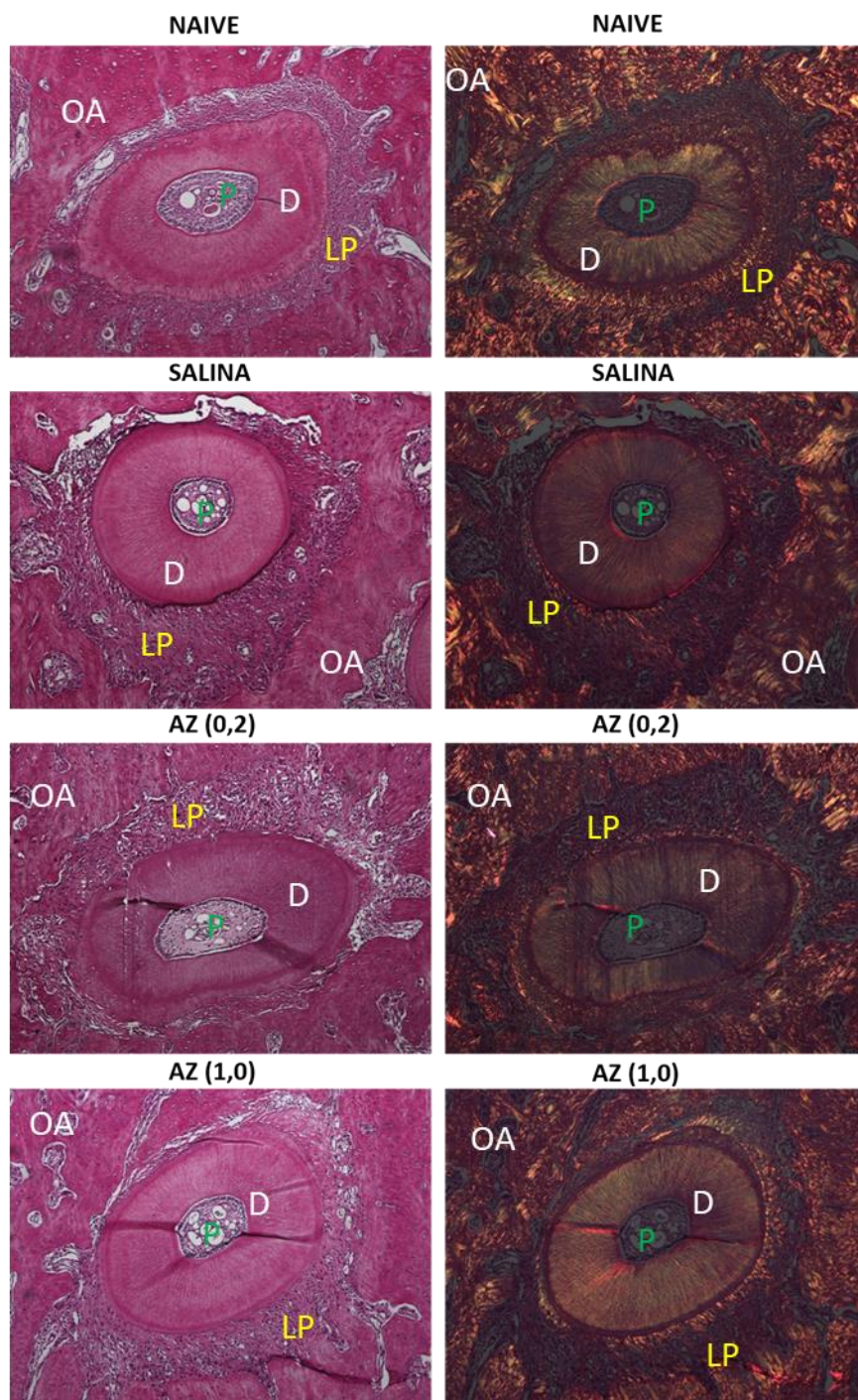
A força aplicada no deslocamento dentário altera as fibras periodontais, que é constituída por fibras colágenas tipo I e tipo III. Ao avaliar o colágeno total, não foi observado diferenças entre os grupos, porém ao analisar a diferenciação das fibras colágenas, verifica-se uma redução da relação de colágeno tipo I/ tipo III nos grupos que tiveram movimentação dentária induzida ($p < 0,05$) (Figura 27 e Figura 28).

Figura 27. Análise da relação do colágeno tipo I/ tipo III no ligamento periodontal do lado de tração



Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Análise histopatológica da relação fibras colágenas tipo I/ tipo III na matriz óssea do lado de tração nos grupos experimentais Naive, Salina, AZ (0,2) e AZ (1,0). Teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn's

Figura 28. Fotomicrografia do corte transversal da raiz DV coradas com *picrosirius red* e sob filtro de luz polarizada nos grupos experimentais N, Sal, AZ (0,2) e AZ (1,0)

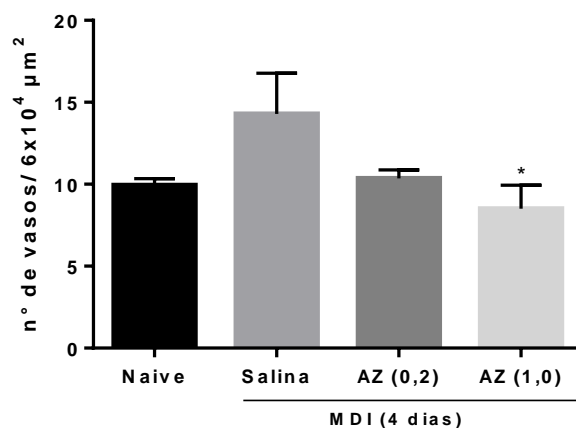


Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Corte transversal da raiz DV em coloração com HE e picrosirius sob luz polarizada. (AO)- Osso Alevolar, (D)- Dentina, (LP) – Ligamento Periodontal, (P)-Polpa.

g. Presença e área dos vasos no ligamento periodontal

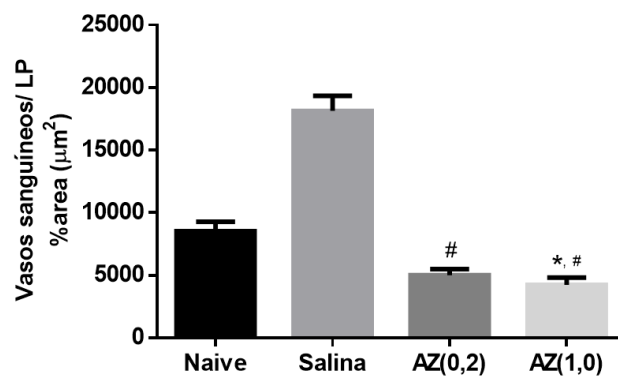
A aplicação da força ortodôntica promove um aumento do número de vasos do lado de tração no grupo salina, embora não seja significativo em relação ao naive. O grupo tratado com AZ (1,0) reduziu a vascularização no ligamento periodontal quando comparado ao grupo salina ($p=0,010$) (Figura 29). O tratamento com AZ (0,2) ($p<0,001$) e AZ (1,0) ($p<0,001$) reduziu a área dos vasos quando comparado ao grupo salina (Figura 30). Na descrição histológica observa-se redução da hemorragia e do diâmetro dos vasos sanguíneos nos grupos tratados com AZ (Figura 31).

Figura 29. Análise histopatológica do efeito do AZ na quantidade de vasos sanguíneos por área $10^4 \mu\text{m}^2$



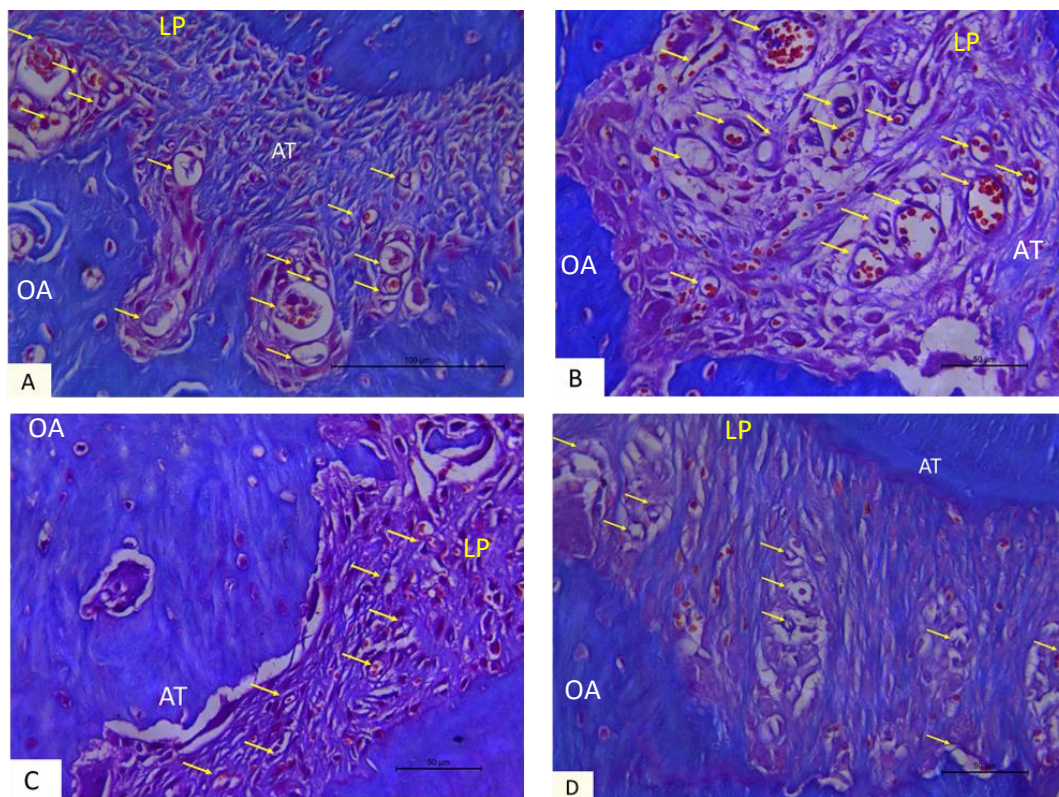
Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Análise do efeito do AZ na média por campos da quantidade de vasos sanguíneos delimitado por área de $10^4 \mu\text{m}^2$ nos grupos experimentais. Barras representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. (*) indica diferença quando comparado ao Grupo Salina (*kruskal Wallis test* $p=0,015$ e *Dunn's pos-hoc test*)

Figura 30. Análise histopatológica do efeito do AZ no percentual da área dos vasos sanguíneos



Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Análise do efeito do AZ na área dos vasos sanguíneos no lado de tração do LP nos grupos experimentais. Barras representam média \pm EPM de 6 animais por grupo. (*) indica diferença quando comparado ao Grupo Naive e (#) indica diferença quando comparado ao grupo salina (kruskal Wallis test $p < 0,001$ e Dunn's post-hoc test)

Figura 31. Fotomicrografia da análise dos vasos sanguíneos no ligamento periodontal com efeito do AZ, através da coloração de *Mallory*



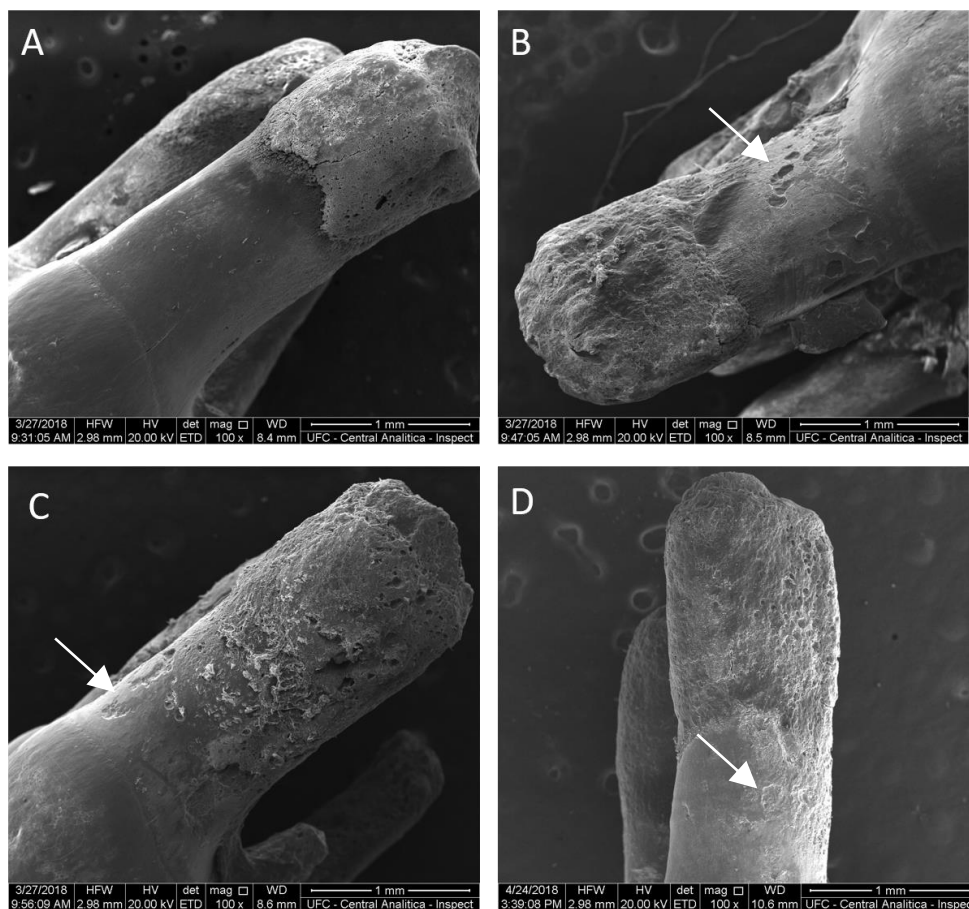
Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Análise do número de vasos sanguíneos no ligamento periodontal da raiz DV nos grupos experimentais (A) Naive, (B) salina, (C) AZ (0,2) e (D) AZ (1,0). A seta amarela indica vasos sanguíneos. (LP) – ligamento periodontal, (AT) – área de tração, (OA) – osso alveolar. As barras indicam 50 µm, coloração Mallory, 400x de magnitude.

6.5 Avaliação da porção inorgânica do dente e periodonto por MEV e micro CT na maxila e no fêmur

a. Reabsorção radicular por MEV

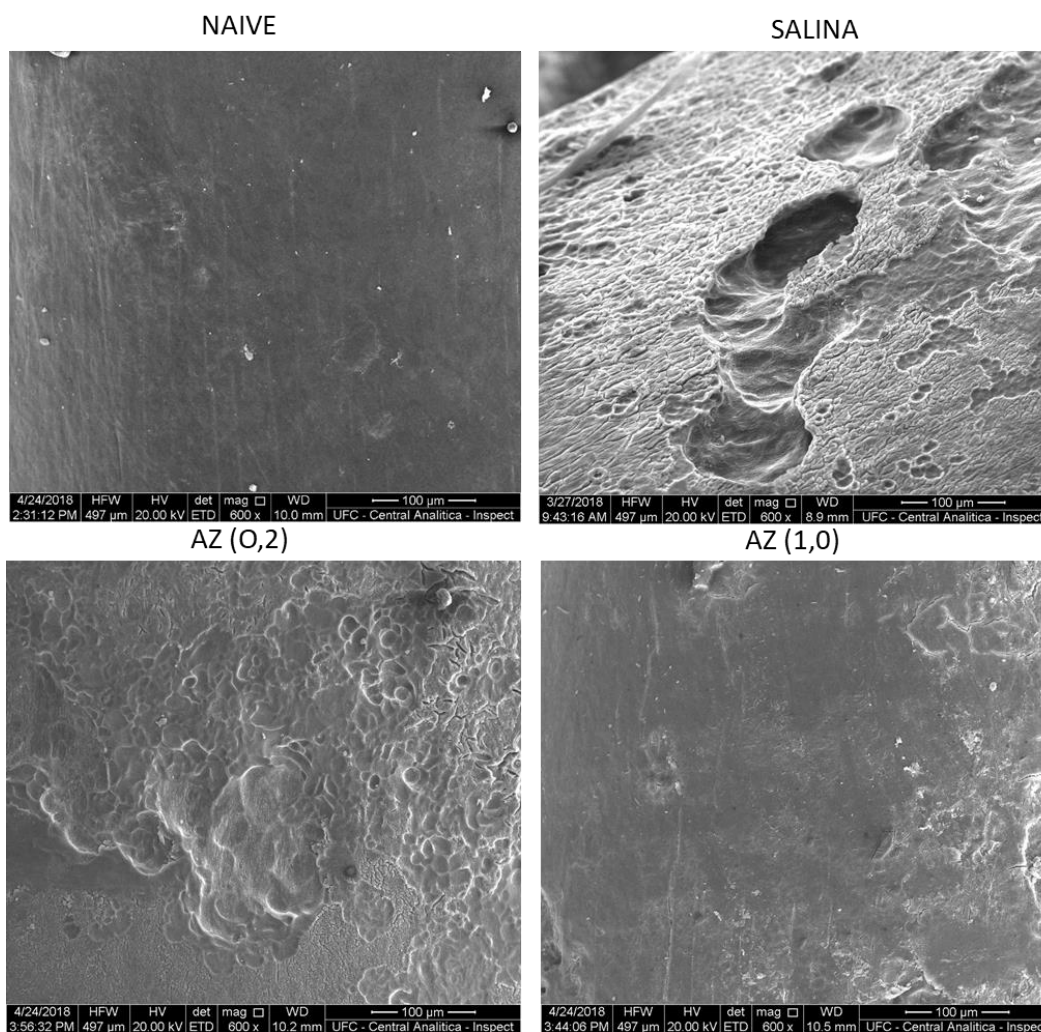
Foi observado que a força ortodôntica promoveu uma reabsorção radicular externa nos grupos com deslocamento dentário, sendo mais evidente com 21 dias da MDI. No grupo tratado com AZ na maior concentração verifica-se uma redução da reabsorção radicular em relação ao salina (Figura 32). Na avaliação por MEV, verifica-se no grupo naive, a raiz íntegra, sem perfurações; Salina, reabsorções radiculares em forma de crateras em toda extensão da raiz avaliada; AZ (0,2) e AZ (1,0) as reabsorção radiculares permanecem, porém em menor intensidade (Figura 33).

Figura 32. Eletrofotomicrografia do efeito do AZ na superfície radicular com 21 dias de MDI, análise por MEV com magnitude de 100x



Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Análise da reabsorção radicular na raiz MV nos grupos experimentais (A) Naive, (B) salina, (C) AZ (0,2) e (D) AZ (1,0). As barras indicam 100 μ m, MEV, 100x de magnitude.

Figura 33. Eletrofotomicrografia da análise por MEV, efeito do AZ na raiz MV no período de 21 dias de MDI, com magnitude de 600x

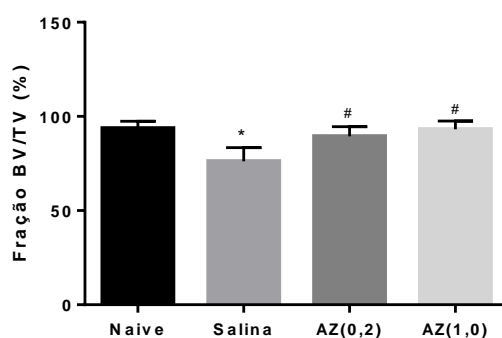


Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Análise da reabsorção radicular na raiz MV nos grupos experimentais Naive, salina, AZ (0,2) e AZ (1,0). As barras indicam 1mm, MEV, 600x de magnitude.

b. Microarquitetura da porção inorgânica do osso maxilar: através da análise da quantidade de volume ósseo e separação entre as trabéculas no osso maxilar por micro CT

A movimentação dentária induzida reduziu a fração de volume ósseo/volume total (BV/TV) no lado de compressão do grupo salina quando comparado ao grupo naive ($p=0,013$). O tratamento com AZ (0,2) ($p=0,043$) e AZ (1,0) ($p=0,016$) impede esta redução do volume ósseo durante a MDI, caracterizando uma diminuição na reabsorção óssea quando comparado ao grupo salina (Figura 34).

Figura 34. Medidas de densidade de volume ósseo da densidade da fração de volume do osso/volume total (BV/TV) no lado de compressão do osso alveolar da raiz distovestibular

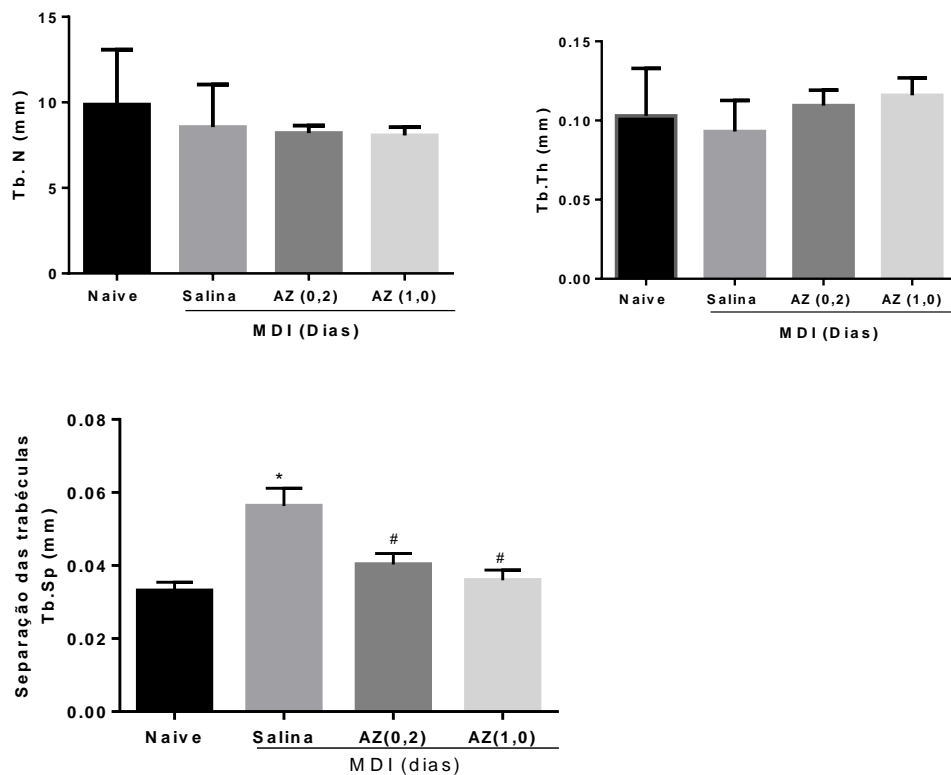


Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda. Análise da porção inorgânica da fração do volume do osso/volume total do osso maxilar no lado de compressão da raiz DV nos grupos Naive, Salina, AZ (0,2) e AZ (1,0). (*) indica diferença quando comparado ao grupo naive (#) indica diferença quando comparado ao grupo salina. (ANOVA $p<0,001$, Levene $p=0,040$, Games-Howell pos-hoc test).

A aplicação da força ortodôntica altera o osso trabeculado do lado de compressão, em relação a separação entre as trabéculas Tb.Sp (mm), foi observado um aumento no grupo salina quando comparado ao naive ($p=0,001$). O tratamento com AZ (0,2) ($p=0,014$) e AZ (1,0) ($p=0,005$) reduz a separação entre as trabéculas quando comparado ao grupo salina. O número de trabéculas (Tb.N) e a espessura (Tb.Th) não foi observado modificações significativas entre os grupos (Figura 35).

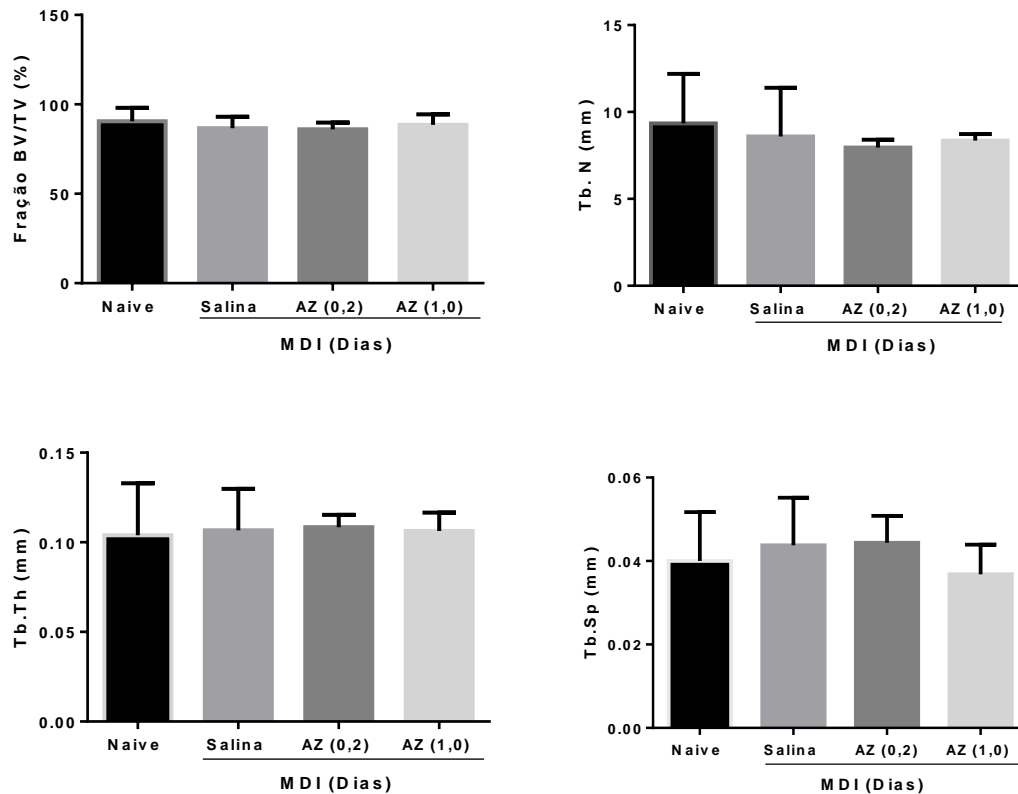
A avaliação do osso alveolar no lado de tração não foi observada alteração significativa na composição óssea em nenhum parâmetro avaliado entre os grupos experimentais (Figura 36).

Figura 35. Medidas de densidade de número de trabéculas (Tb.N), espessura (Tb.Th) e separação entre as trabéculas (Tb.Sp) no lado de compressão do osso alveolar da raiz distovestibular



Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda. Análise da microarquitetura do osso trabeculado do lado de compressão da raiz DV nos grupos Naive, Salina, AZ (0,2) e AZ (1,0). (*) indica diferença quando comparado ao grupo naive (#) indica diferença quando comparado ao grupo salina. (ANOVA $p=0,001$, Levene $p=0,250$, Tukey pos-hoc test).

Figura 36. Medidas de densidade de número de trabéculas (Tb.N), espessura (Tb.Th) e separação entre as trabéculas (Tb.Sp) no lado de tração do osso alveolar da raiz distovestibular

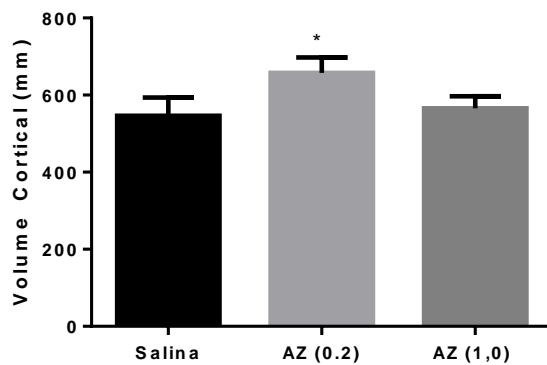


Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda. Análise da microarquitetura do osso alveolar do lado de tração da raiz DV nos grupos Naive, Salina, AZ (0,2) e AZ (1,0).

c. Microarquitetura da porção inorgânica do osso femoral, através do volume ósseo cortical e diâmetro do canal medular por micro CT

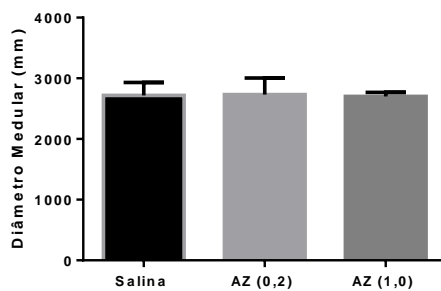
Na análise da microarquitetura do fêmur, foi observado dois grupos experimentais: salina e ácido zoledrônico. O tratamento com AZ mostrou um aumento do volume cortical da matriz óssea quando comparado ao grupo salina ($p=0,004$) (Figura 37), porém não interferindo no diâmetro do canal medular ($p=0,938$) (Figura 38).

Figura 37. Análise do volume da cortical óssea do fêmur em mm³



Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda. Análise da porção inorgânica do fêmur, através do volume da cortical óssea (*) indica diferença quando comparado ao grupo salina (Teste de Levene $p=0,425$ e Teste t de Student $p=0,004$)

Figura 38. Análise do diâmetro medular (mm) do canal medular do fêmur

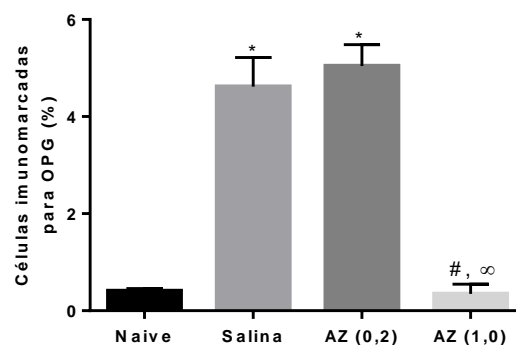


Fonte. Elaborado pelo autor (2018). Legenda. Análise da porção inorgânica do fêmur, através da mensuração do diâmetro do canal medular (Teste de Levene $p=0,328$ e Teste t de Student $p=0,938$)

6.6 Análise da imunomarcção da proteína OPG em células ósseas

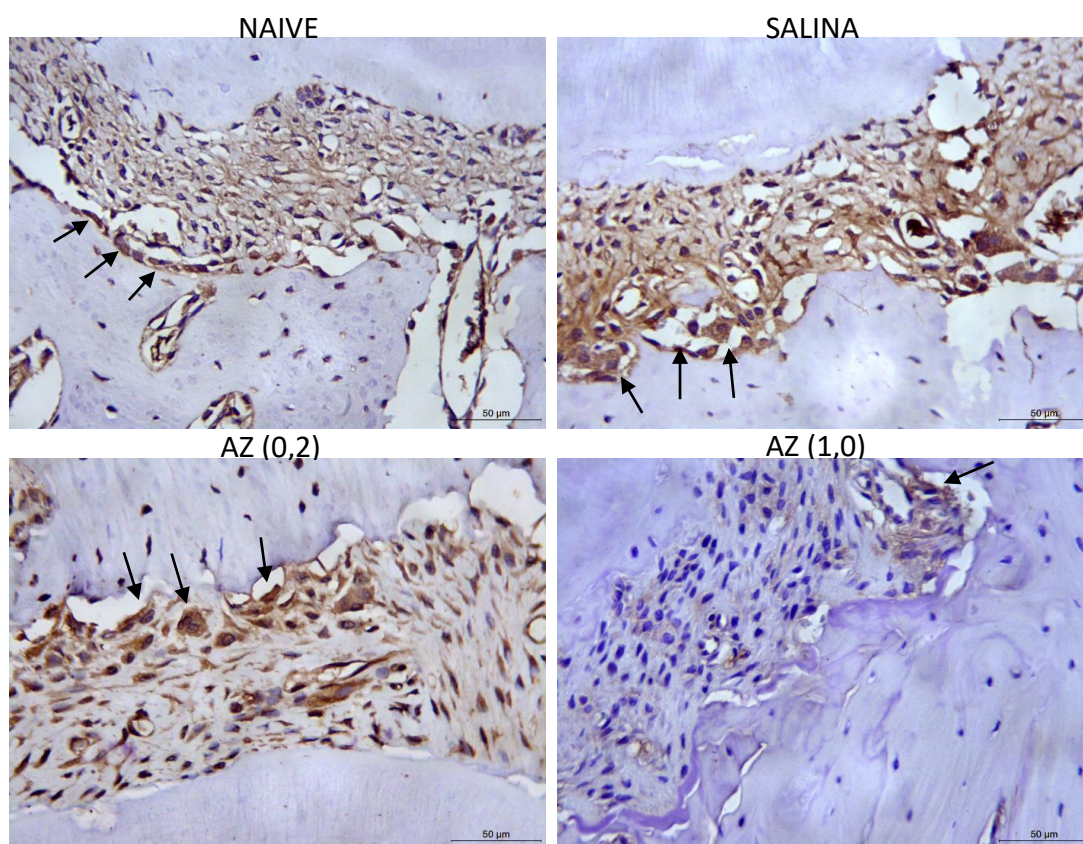
A imunomarcção da proteína OPG foi avaliada no tecido ósseo no 4º dia da MDI. O deslocamento dentário aumentou a imunomarcção desta proteína no grupo salina quando comparado ao naive ($p=0,023$). O tratamento com AZ resultou em redução de células imunomarcadas para OPG no grupo com maior concentração quando comparado ao grupo salina ($p<0,001$) e ao grupo AZ (0,2) ($p<0,001$) (Figura 39, Figura 40).

Figura 39. Efeito do AZ sobre a imunomarcção de OPG presentes nas células do tecido ósseo nos grupos experimentais Naive, Salina, AZ (0,2) e AZ (1,0)



Fonte: Elaborado pelo autor (2018). Legenda. Análise da expressão da proteína OPG no tecido ósseo após 4 dias da MDI nos grupos naive, salina, AZ (0,2) e AZ (1,0). (*) indica diferença quando ao grupo naive; (#) quando comparado ao grupo salina; (∞) quando comparado ao grupo AZ (0,2). Teste Kuskal-Wallis test $p<0,001$

Figura 40. Fotomicrografia do efeito do AZ nas células imunomarcadas com OPG no tecido ósseo



Fonte.Elaborado pelo autor (2018). Legenda: Análise das células imunomarcadas com a proteína OPG no tecido ósseo no lado de tração do ligamento periodontal da raiz DV nos grupos experimentais (A) Naive, (B) salina, (C) AZ (0,2) e (D) AZ (1,0). A seta preta indica a imunomarcagem para OPG. As barras indicam 50 µm, 400x de magnitude.

7 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou o efeito do tratamento com o ácido zoledrônico (AZ) na movimentação dentária induzida (MDI), em diferentes períodos de observação.

A escolha da utilização de um modelo experimental em ratos teve como objetivo ampliar os critérios de análise, investigando as alterações macro e microscópicas nos dentes movimentados e em seus respectivos tecidos periodontais, o que seria inviável em uma pesquisa envolvendo pacientes submetidos a tratamento ortodôntico. Utilizou-se movimento de inclinação mesial do primeiro molar superior esquerdo, seguindo protocolo bem estabelecido na literatura (MATSUZAWA et al., 2016).

A primeira fase do presente estudo investigou os aspectos microscópicos da movimentação dentária induzida, em diferentes períodos de tempo, para selecionar o delineamento experimental mais adequado para a investigação do efeito do tratamento com AZ na MDI. A escolha dos períodos de observação nessa primeira etapa foi baseada nos poucos estudos descritos na literatura envolvendo a análise de parâmetros relevantes na MDI (BRUNET et al., 2016; FERNANDÉZ-GONZÁLEZ et al., 2015). Desta forma, foram estabelecidos os dias 1,4,7,11,14 e 21, considerando o dia 0 como o início da movimentação dentária, dia no qual o dispositivo ortodôntico foi instalado.

As alterações nos tecidos periodontais em decorrência do deslocamento dentário foram analisadas no primeiro molar superior, por ser considerado o dente ideal para o estudo experimental de MDI em ratos (MATSUZAWA et al.,2016). Este dente não apresenta rizogênese contínua e suas raízes não estão próximas das raízes dos incisivos superiores (CONSOLARO et al.,2005). Essas características anatômicas favorecem a MDI desse dente, primeiro molar superior, e o colocam em vantagem em relação aos incisivos, que apresentam rizogênese contínua, e aos molares inferiores, que podem sofrer interferência das raízes dos incisivos inferiores durante a inclinação mesial, por estarem muito próximos (FRACALOSSI, 2007). O primeiro molar superior pode apresentar de 4 a 6 raízes, na maioria das vezes 5 raízes, denominadas: mesiovestibular, mesiolingual, intermediária vestibular, distoventibular e distolingual (FRANCALOSSI et al., 2007). No presente estudo a raiz

distovestibular foi selecionada para as análises microscópicas devido à sua maior estabilidade e por apresentar menos variação anatômica em relação às demais raízes desse dente (HASHIMOTO et al., 2013).

A intensidade da força utilizada em estudos experimentais que envolvem MDI em ratos apresenta uma ampla variação, entre 10gf e 100gf. No entanto, os estudos não sugerem uma relação direta entre intensidade de força e movimentação dentária. Em outras palavras, não se pode afirmar que quanto maior a força aplicada, maior a movimentação dentária. No entanto, está bem estabelecido na literatura que quanto maior a força sobre o dente, maior o risco de reabsorção radicular (Li et al., 2018). No presente estudo, optou-se em utilizar a força de 50gf, de acordo com as pesquisas de Taddei e colaboradores (2012), nas quais foram comparados diferentes protocolos de movimentação dentária em ratos, analisando diferentes intensidades de força aplicada (10gf, 25gf, 35gf e 50gf). Os autores observaram maiores alterações dentárias e periodontais, incluindo maior recrutamento de osteoclastos e reabsorção radicular, quando as forças de 35gf e 50gf foram utilizadas, sendo que a força de 50gf foi a que resultou em alterações microscópicas mais evidentes e, por esse motivo, foi selecionada para o presente trabalho. Vale salientar que para avaliar os efeitos do AZ nos tecidos dentários e periodontais, é imprescindível o uso de uma intensidade de força capaz de induzir alterações nesses tecidos.

As concentrações (doses) de AZ utilizados no presente estudo foram selecionadas a partir de pesquisas prévias descritas na literatura que investigaram se o uso contínuo de bifosfonatos, incluindo AZ, predispõe a osteonecrose dos maxilares após extração dentária (SILVA et al., 2015). É importante ressaltar que o modelo experimental utilizado no presente trabalho, assim como as concentrações de AZ avaliadas, tempo e via de administração (endovenosa), simulam as condições clínicas de um tratamento ortodôntico submetido à uma pessoa que faz uso crônico de doses maiores de AZ, por ser portadora de desordens metabólicas ósseas importantes, como às relacionadas com metástases ósseas.

Os resultados coletados na primeira fase experimental apontaram o dia 4, ou seja 4 dias após o início da aplicação da força ortodôntica, como o dia ideal para estudar os efeitos do tratamento com o AZ nas alterações induzidas pela MDI no periodonto, considerando alguns parâmetros histológicos na

análise dos lados de compressão e tração, incluindo o número de osteoclastos, as áreas de necroses, os tipos de colágeno, a vascularização do ligamento periodontal e reabsorção óssea. O 21º dia foi o escolhido para a análise microscópica das alterações na raiz dentária e também para a avaliação do deslocamento do dente, por ser o período em que se observou maior reabsorção radicular e maior taxa de deslocamento na curva da MDI.

O uso de AZ, potente bisfosfonato de terceira geração, representa um fator de risco para a osteonecrose dos maxilares, por mecanismos ainda não esclarecidos que envolvem alterações na vascularização, conforme descrito na literatura (RUGGIERO et al., 2006). Marx e colaboradores (2003) relataram os primeiros casos de osteonecrose dos maxilares associados com o uso contínuo de bisfosfonatos e evidenciaram que os procedimentos odontológicos eram fatores predisponentes no desenvolvimento da necrose óssea. No entanto, não se observou no presente estudo, nem nas análises macroscópicas e tampouco nas microscópicas, sinais clínicos de necrose, preconizados por Ruggiero e colaboradores (2009), que incluem fístulas e/ou abscessos. Ao contrário, foi verificado integridade tecidual do osso, sem a presença de áreas hialínicas e de lacunas vazias (sem osteócitos), além da integridade da mucosa oral. Foi observado, no entanto, uma diminuição considerável na vascularização do ligamento periodontal do grupo tratado com AZ, em relação ao grupo controle (salina). A administração de AZ resultou na diminuição tanto no número de vasos, como na área ocupada por esses vasos. Esse resultado nos pareceu relevante uma vez que a hipóxia é uma das causas mais comuns de lesões celulares que levam à necrose. Por outro lado, sabe-se que a irrigação sanguínea do tecido ósseo se dá principalmente através de vasos que partem do periósteo, uma bainha de tecido conjuntivo que reveste os ossos externamente. A ocorrência de hipóxia no ligamento periodontal, portanto, não teria um impacto importante no osso alveolar, resultando em necrose óssea. O presente trabalho investigou pela primeira vez parâmetros relacionados à osteonecrose associada ao uso de AZ em um modelo de MDI. A osteonecrose dos maxilares em decorrência da MDI é apenas citada nas revisões sistemáticas (GHONEIMA et al., 2010; POELMANS et al., 2012) e apenas três casos clínicos relatados na literatura abordaram a relação do uso dos bisfosfonatos e o surgimento de osteonecrose da mandíbula em pacientes

submetidos a tratamento ortodôntico (RINCHUSE et al., 2007; ZAHROWSKI et al., 2007). A escassez de estudos clínicos e experimentais tornam, portanto, os dados coletados no presente trabalho extremamente relevantes.

Os dados apresentados no presente trabalho mostram claramente que o AZ, nas duas concentrações avaliadas, interferiu no deslocamento dentário, apresentando uma menor taxa de MDI, em relação ao grupo salina (grupo de animais submetidos à aplicação da força ortodôntica, mas que não receberam AZ), observado no 21º dia experimental. Esse resultado pode ser compreendido levando-se em consideração que o AZ apresenta potente efeito antirreabsortivo no tecido ósseo. Estudos descritos na literatura reforçam nossos achados (BRUNET et al, 2016; SIRISOONTORN et al., 2012). No entanto, resultados diferentes também foram encontrados. Seifi e colaboradores (2017), avaliando o efeito local do AZ na reabsorção óssea e radicular, relatam que a administração local de AZ, na mucosa alveolar, não interferiu na MDI. Provavelmente esse resultado seja devido à administração local, o que limita consideravelmente à disponibilidade do fármaco no osso e, conseqüentemente, sua ação.

O efeito antirreabsortivo do tratamento com AZ no osso alveolar pode ser claramente observado na análise do lado de compressão do ligamento periodontal, área estabelecidamente relacionada à reabsorção óssea na movimentação ortodôntica. Vale a pena lembrar, para um melhor entendimento dos resultados, que durante o tratamento ortodôntico, o osso é seletivamente removido em algumas áreas (áreas de compressão) e adicionado em outras (áreas de tração), enquanto o dente se move carregando os tecidos de sustentação, dos quais faz parte o ligamento periodontal. De fato, o ligamento periodontal desempenha um papel fundamental para que o processo de movimentação dentária ocorra (FELLER et al., 2015). Sua compressão induz estímulos geradores de inflamação local, favorecendo o surgimento de um microambiente susceptível à reabsorção óssea, como uma reação tecidual à força aplicada (JACOBS et al., 2015). Observamos que o espaço ocupado pelo ligamento periodontal (espessamento do ligamento periodontal) no lado de compressão dos grupos tratados com AZ apresenta-se menor quando comparado ao grupo salina. A maior reabsorção do osso alveolar observada na área de compressão do grupo salina explica esse

resultado, uma vez que, quanto maior a área reabsorvida, maior é o espaço disponível a ser ocupado pelo ligamento periodontal. Portanto, a menor espessura do ligamento periodontal na área de compressão, observada no grupo AZ, está diretamente relacionada à menor perda óssea. Essa hipótese é reforçada pelo menor número (estatisticamente menor) de osteoclastos quantificados na área de compressão do grupo tratado com a maior concentração de AZ em relação ao salina. Esse achado explica a redução significativa do deslocamento dentário observado nos grupos AZ. O osso alveolar não reabsorvido funciona como uma barreira física, impedindo a movimentação dentária. O menor número de osteoclastos no grupo AZ reforça os mecanismos de ação desse fármaco descritos na literatura, que envolve a ativação de caspases, e consequente apoptose de osteoclastos, (BRUNET et al., 2016; FRANZONI et al., 2017) e inibição da formação e do recrutamento de osteoclastos a partir de células precursoras imaturas (SEIFI et al., 2017). O menor número de osteoclastos encontrados nos grupos AZ pode, ainda, estar relacionado à menor vascularização observada no ligamento periodontal dos animais desse grupo, considerando que os osteoclastos são formados a partir da fusão de monócitos que atingem o osso através da corrente sanguínea (NARIMIYA et al., 2017). A maior compressão do ligamento periodontal no grupo AZ pode, ainda, estar diretamente relacionada com a diminuição do número e da área de vasos sanguíneos do ligamento periodontal desse grupo (AZ) quando comparado ao salina, achado que foi discutido anteriormente.

O efeito antirreabsortivo no tecido ósseo do AZ foi confirmado através da microscopia confocal utilizando as lâminas coradas com HE. A autofluorescência do colágeno permite essa visualização através do laser de emissão que corresponde ao canal de emissão de fluorescência FITC-verde. A preservação da matriz óssea alveolar, com redução das lacunas de reabsorção óssea foi claramente observada nos grupos tratados com AZ em relação ao grupo salina.

Os resultados coletados no presente estudo a partir da análise da porção mineral do osso alveolar através de microtomografias computadorizadas (Micro-CT) confirmam mais uma vez a ação antirreabsortiva do AZ no tecido ósseo durante a MDI. Essa análise é extremamente relevante, uma vez que a micro-CT permite a avaliação tridimensional da microarquitetura

do osso alveolar (KHAJURIA et al., 2014). Na avaliação do osso trabeculado do grupo salina foi observado que a movimentação dentária induzida, aumenta a separação entre as trabéculas (Tb.Sp), sem alterar o número dessas trabéculas (Tb.N) e, tampouco, a espessura de trabéculas (Tb.Th) no lado de compressão. O tratamento com AZ, mantém o número e espessura das trabéculas, mas reduz, no entanto, a separação dessas trabéculas, quando comparado ao grupo salina. Esse resultado deve-se, provavelmente, à maior compressão a qual esse osso é submetido, quando comparado ao osso alveolar do grupo salina, uma vez que o AZ impede a reabsorção óssea no lado de compressão. A manutenção da integridade da matriz óssea, observada em todos os grupos, sem alteração na microarquitetura do osso alveolar, confirma as análises histopatológicas, que não evidenciaram osteonecrose do osso alveolar, reforçando que no presente estudo, o AZ não induziu necrose óssea.

Trabalhos recentes sugerem que os efeitos antirreabsortivos do AZ na MDI podem ser utilizados a favor do movimento ortodôntico. De fato, um estudo recente investiga os efeitos do AZ relacionados à preservação da matriz óssea que circunda o dente de ancoragem, e não do dente que se deseja movimentar, durante o tratamento ortodôntico. O estudo demonstra que a ação local do AZ no osso alveolar do dente de ancoragem pode prevenir um dos efeitos indesejados do tratamento ortodôntico, que é o deslocamento do dente de ancoragem (SEIFI et al., 2017). Outros estudos utilizando o AZ com aplicação local em mucosa adjacente ao dente de ancoragem (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2015), apresentam perspectivas favoráveis ao tratamento ortodôntico, preservando o osso alveolar do dente de ancoragem, desde que no planejamento não haja necessidade de exodontia, o que poderia interferir no fechamento de espaços dentários, impedindo a conclusão do tratamento ortodôntico (ORTEGA et al., 2012).

O lado de tração, onde existe distensão do ligamento periodontal (face oposta à área de compressão) foi também avaliado no presente estudo. Está bem estabelecido na literatura que durante o tratamento ortodôntico, no lado de tração, ocorre o estiramento das fibras colágenas do ligamento periodontal (NISHIYAMA et al., 2015), o que induz a liberação de estímulos que promovem a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, células que

produzem o tecido ósseo (BARCIA et al., 2017). Dessa forma, os osteoclastos e osteoblastos iniciam o processo de remodelação óssea (fundamental para a movimentação dentária induzida), com formação óssea no lado de tração e reabsorção na face de compressão (LI et al., 2015). No presente trabalho, não se observou diferença significativa entre os grupos AZ e salina no que se refere ao espaço ocupado pelo ligamento periodontal na área de tração, apenas na área de compressão, como foi discutido anteriormente. Esse resultado reforça que a diminuição da movimentação dentária observada no grupo AZ, quando comparado ao grupo salina, deve-se à falta de reabsorção óssea no lado de compressão, e não a alterações morfológicas no lado de tração, como por exemplo, a falta de estiramento das fibras periodontais. As análises utilizando microscopia confocal não evidenciaram diferenças na morfologia e organização das fibras periodontais no lado de tração entre os grupos AZ e salina. As análises de micro-CT do tecido ósseo, no lado de tração, não evidenciou diferenças na microarquitetura do osso alveolar entre os grupos salina e AZ, confirmando que os efeitos do AZ na MDI são evidentes no lado de compressão.

O número de osteoblastos no lado de tração não foi quantificado no presente estudo. No entanto, baseado em trabalho recente que sugere um efeito tóxico de altas concentrações de AZ em osteoblastos (GAO et al., 2017), foi investigado no presente trabalho, através de imunohistoquímica, a expressão de osteoprotegerina (OPG), proteína produzida e liberada por osteoblastos ativados. Observamos uma redução significativa na expressão de OPG no grupo tratado com a maior dose de AZ quando comparado ao salina, o que sugere uma possível ação tóxica do AZ em osteoblastos, corroborando com os estudos de Gao e colaboradores (2017). Existem, entretanto, controvérsias na literatura sobre a ação do AZ em osteoblastos (PATNTIRAPONG et al., 2012; BASSO et al., 2013). Nossos resultados sugerem uma possível ação indireta do AZ em osteoclastos, via osteoblastos. Em outras palavras, a diminuição no número de osteoclastos margeando o osso alveolar dos animais tratados com AZ pode estar relacionada com a diminuição de osteoblastos, uma vez que para iniciar o seu processo de diferenciação, os osteoclastos necessitam da presença de células osteoblásticas, capazes de produzir fatores de diferenciação e ativação

(YAMAGUCHI et al., 2009; ALAZZAWI et al., 2018). Estudos adicionais, no entanto, utilizando outros marcadores de osteoblastos são necessários para confirmar essa hipótese.

Para investigar os efeitos do tratamento com AZ no ligamento periodontal durante a MDI, avaliamos a presença de áreas necróticas (evidenciadas histologicamente por áreas hialínicas, pobre em células e fibras) e também a composição e distribuição das fibras colágenas, principal componente do ligamento periodontal, através da análise de lâminas coradas com picosirius red, corante que permite a visualização e diferenciação das fibras colágenas dos tipos I, a mais abundante no ligamento periodontal, e tipo III (LI et al., 2018). Essa análise foi motivada por estudos que fornecem evidências que o AZ apresenta efeitos tóxicos/inflamatórios nas células do ligamento periodontal (SHEPER et al., 2009; BARROS-SILVA et al., 2016). Dados da literatura sugerem que a diminuição considerável da reabsorção óssea durante o movimento dentário induzido (exatamente o que foi observado nos grupos AZ em relação ao salina) resulta na compressão contínua no LP, o que leva à redução de oxigênio nos tecidos, favorecendo a liberação de prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias, promovendo um microambiente favorável à necrose celular (GHONEIMA et al., 2010). De acordo com esse estudo, observamos uma diminuição significativa na vascularização do ligamento periodontal nos grupos AZ. Adicionalmente, a proporção de áreas hialínicas no ligamento periodontal desses grupos (tratados com AZ) foi significativamente maior quando comparado ao grupo salina, o que corrobora com Kubek e colaboradores. (2010). Esse achado é facilmente compreendido quando se leva em conta que as fibras periodontais (no lado de compressão) dos grupos tratados com AZ estão bem mais comprimidas do que às fibras do grupo salina. O aumento significativo de áreas necróticas no ligamento periodontal nos grupos AZ, pode também estar relacionado ao mecanismo de ação desse fármaco, impedindo o recrutamento e formação de células gigantes, multinucleadas, formadas a partir da fusão de macrófagos. Essas células são fundamentais na fagocitose dos restos necróticos, como os fragmentos de células e/ou fibras. Essa especulação baseia-se no efeito inibitório (já bem estabelecido na literatura) do AZ na diferenciação de osteoclastos, células multinucleadas, formadas a partir da mesma célula

precursora que dá origem à célula gigante. Seguindo esse raciocínio, o AZ estaria dificultando/impedindo o recrutamento de células precursoras e a formação de células fagocitárias. No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese.

As análises do ligamento periodontal realizadas no presente estudo em lâminas coradas com picrosirius red confirmam dados da literatura que demonstram que durante a movimentação ortodôntica, o osso alveolar e fibras periodontais são continuamente remodeladas, e estruturas periodontais são dinamicamente reconstruídas através de reações biológicas no ligamento periodontal (NARIMIYA et al., 2017). De fato, a quantidade total de colágeno entre os grupos submetidos à MDI (salina e os grupos AZ) e o grupo naive (animais são submetidos à MDI) não foi diferente, o que sugere o reparo ativo e contínuo das fibras colágenas durante a MDI, confirmando dados da literatura. No entanto, ao analisar as lâminas sob a luz polarizada, foi observado claramente, no lado de tração, uma redução significativa da relação de colágeno tipo I/ colágeno tipo III no ligamento periodontal dos grupos submetidos à movimentação ortodôntica em relação ao grupo naive. Segundo a literatura, o colágeno maduro da fibra periodontal, tipo I, induz a expressão da metaloproteinase (MMP-1) em fibroblastos e osteoblastos em resposta a força ortodôntica aplicada ao dente (HAYAMI et al., 2008), o que resulta na degradação do colágeno, especialmente o do tipo I, que é mais abundante. Durante o reparo do ligamento periodontal, a quantidade de colágeno III aumenta de forma considerável e, gradualmente, vai sendo substituído por colágeno maduro, tipo I (CHENG et al., 2014). Nossos resultados reforçam que ocorre a reconstrução ativa e constante das fibras do ligamento periodontal em dentes movimentados ortodonticamente. O tratamento com AZ não interferiu na dinâmica de reparo das fibras do ligamento periodontal, contradizendo estudos que mostram efeitos tóxicos desse fármaco nas células desse tecido (SHEPER et al., 2009; BARROS-SILVA et al., 2016).

Avaliamos, ainda, no presente trabalho, os efeitos do AZ na raiz dentária. Essa análise foi motivada por estudos prévios que demonstram reabsorção radicular em modelos experimentais de movimentação ortodôntica. A raiz dentária, porção do dente responsável pela sua inserção no osso alveolar, é formada principalmente por dentina, e revestida externamente por

cimento. As fibras do ligamento periodontal se inserem de um lado no osso alveolar e do outro lado no cimento. Dentina e cimento são dois tecidos mineralizados, ambos apresentando composição semelhante ao tecido ósseo, com predominância de colágeno tipo I. Assim como o tecido ósseo, dentina e cimento são degradados por células clásticas, denominadas odontoclastos. No entanto, o odontoclasto é, morfológica e funcionalmente, muito semelhante ao osteoclasto (SIRISOONTORN et al., 2012). Os nomes diferentes atribuídos a essas células por alguns autores deve-se ao tipo de tecido reabsorvido. Observamos que a MDI resultou em reabsorção radicular importante e que o tratamento com AZ preveniu esse efeito. A inibição da formação e do recrutamento de clastos a partir de células precursoras imaturas pelo AZ pode explicar a menor reabsorção radicular, observada no 21º dia experimental, nos animais tratados com a maior concentração desse fármaco. A redução do número e profundidade das lacunas de reabsorção radicular no grupo AZ, quando comparado ao salina, é claramente evidenciada por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura.

A reabsorção radicular é um efeito indesejável do tratamento ortodôntico, normalmente associada à forças de alta magnitude, que promovem maior número de áreas hialínicas (necróticas) e, conseqüentemente, maior formação e ativação de células clásticas (MORI et al.,2010; SEIFI et al., 2017). No presente estudo foi utilizada uma força de 50gf, de acordo com estudos prévios, que corresponde a uma força que excede a intensidade de força possível de movimentar um dente com o mínimo de danos aos tecidos (força ótima). Na movimentação dentária experimental, o uso de uma força que exceda a força ótima propicia a ocorrência de todos os eventos teciduais envolvidos na movimentação ortodôntica em um intervalo de tempo viável para estudos experimentais.

Considerando que foi observado uma redução do espaço trabecular no osso alveolar da maxila dos grupos tratados com AZ, investigamos se essa alteração seria observada em um outro osso do corpo onde a remodelação óssea não estivesse sendo estimulada. O fêmur foi escolhido, tomando como base evidências da literatura que associam fraturas no fêmur à infusão sistêmica do ácido zoledrônico (SÁNCHEZ et al., 2017). O fêmur foi coletado e sua microarquitetura foi analisada por microCT, através da

mensuração da área de osso cortical e do diâmetro do canal medular na região média e proximal da diáfise deste osso longo. Nas amostras analisadas, foi observado um aumento significativo no volume da cortical óssea no grupo que recebeu a menor concentração de AZ em relação ao salina. No entanto, não se observou diferenças no volume ósseo entre os grupos salina e o grupo tratado com a maior dose de AZ. Esse resultado pode ser explicado por um possível efeito tóxico de altas concentrações do AZ em osteoblastos, conforme foi discutido anteriormente no presente trabalho, na discussão dos resultados referentes à reabsorção óssea do osso alveolar.

Em suma, os resultados apresentados mostram claramente que o AZ interfere na MDI. O presente estudo contribui substancialmente para a compreensão dos efeitos do AZ na movimentação dentária, o que é fundamental para a indicação do tratamento ortodôntico em pessoas que fazem uso de altas doses desse fármaco.

8 CONCLUSÃO

Em suma, os resultados deste estudo mostram claramente que o AZ interfere na MDI, reduzindo o deslocamento dentário, provavelmente devido a seus efeitos anti-reabsortivos. Ademais, o tratamento com ácido zoledrônico no presente estudo não induziu osteonecrose.

REFERÊNCIAS

ALAZZAWI, M.M.J.; HUSEIN, A.; ALAM, M.K; HASSAN R.; SHAARI, R. Effect of low level laser and low intensity pulsed ultrasound therapy on bone remodeling during orthodontic tooth movement in rats. **Prog Orthod**, v.19, n. 10, april, 2018.

ALIKHANI, M.; ALYAMI, B.; LEE, I. S.; ALMOAMMAR, S.; VONGTHONGLEUR, T.; ALIKHANI, M.; ALANSARI, S.; SANGSUWON, C.; CHOU, M. Y.; KHOO, E.; BOSKEY, A.; TEIXEIRA, C. C. Saturation of the biological response to orthodontic forces and its effect on the rate of tooth movement. **Orthodontics and Craniofacial Research**, v. 18, n. S1, p. 8–17, 2015.

ALLEN, M. R. The effects of bisphosphonates on jaw bone remodeling, tissue properties, and extraction healing. **Odontology**, v. 99, n. 1, p. 8-17, 2011.

ALPHY, A.; KANNAN, T.; NORAZMI, M.; NURUL, A. Interleukin-17A promotes osteogenic differentiation by increasing OPG/RANKL ratio in stem cells from human exfoliated deciduous teeth, **Journal of engineering and regenerative medicine**, 2018.

AMERICAN ASSOCIATION OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGEONS (AAOMS). Position paper on bisphosphonate: related osteonecrosis of the jaws. **J Maxillofac Surg**, V. 65, N. 3, P. 369-76, 2007.

AN, J.; LI, Y.; LIUWANG, Z.; ZHANG, B. A micro-CT study of microstructure change of alveolar bone during orthodontic tooth movement under different force magnitudes in rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 5, p. 1793–1798, 2017.

ANDRADE, T.A.; IYER, A.; DAS, P.K. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Braz J Med Biol Res**. v. 44, n.01, p.1036-1047, 2011.

ARAÚJO - JUNIOR, et al. Atorvastatin Decreases Bone Loss, Inflammation and Oxidative Stress in Experimental Periodontitis. **PLoS ONE**, v.8, n.10, e75322 , 2013.

ARAUJO, V.M.A. **A atorvastatina e o alendronato interferem na movimentação dentária induzida em ratos via indução das atividades inflamatória e reabsortiva e aumento do anabolismo ósseo**- 2015. 113 f. Dissertação (mestrado em farmacologia) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará : Ceará, 2015.

BARCIA, J. M.; PORTOLÉS, S.; PORTOLÉS, L.; URDANETA, A. C.; AUSINA, V.; PÉREZ-PASTOR, G. M. A.; ROMERO, F. J.; VILLAR, V. M. Does oxidative stress induced by alcohol consumption affect orthodontic treatment outcome? **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–11, 2017.

BARTZELA, T.; TÜRP, J. C.; MOTSCHALL, E.; MALTHA, J. C. Medication effects on the rate of orthodontic tooth movement: A systematic literature review **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, 2009.

BASSO, F.G.; TURRIONI, A.P.S.; HEBLING., J.; COSTA., C.A.S. Inhibition of osteoblast activity by zoledronic acid. **J Bras Patol Med Lab**, v. 49, n.5, p. 368-371, out.,2013.

BONEWALD, L.F; JONNISON, M.L. Osteocytes mechanosensing and WNT signaling. **Bone**, v.42, n.4, p.606-15, 2008.

BRUNET, M. D.; ARAUJO, C. M. De; BATISTA, A. C.; JOHANN, R.; CAMARGO, E. S.; TANAKA, O. M. Effects of Zoledronic Acidon Orthodontic Tooth Movement in Rats. **Brazilian dental Journal**, v. 27, p. 515–523, 2016.

BURSTONE CJ The biomechanics of tooth movement. In: RR Kraus BS (Ed.); **Vistas in orthodontics**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1962, p. 10.

CAETANO-LOPES, J.; LOPES, A.; RODRIGUES, A.; FERNANDES, D.; PERPÉTUO, I. P.; MONJARDINO, T.; LUCAS, R.; MONTEIRO, J.; KONTTINEN, Y. T.; CANHÃO, H.; FONSECA, J. E. Upregulation of inflammatory genes and downregulation of sclerostin gene expression are key elements in the early phase of fragility fracture healing. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

CARVALHO, H. F.; TABOGA, S. B.; FELISBINO, S. L. Fluorescence and confocal laser scanning microscopy of HeE stained sections for the study of elastic fibers in skin and in some skin disorders. **Braz J Morphol Sci.**, v. 16, n. 1, p. 97-103, 1999.

CASTRO L.F.; SILVA, A.T.A.; CHUNG M. C. Bifosfonatos (BFs) como transportadores steotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos. **Quim Nova** 2004, v. 27, n.3, p.456-60, 2004.

CHAE, H. S.; PARK, H.-J.; HWANG, H. R.; KWON, A.; LIM, W.-H.; YI, W. J.; HAN, D.-H.; KIM, Y. H.; BAEK, J.-H. The effect of antioxidants on the production of pro-inflammatory cytokines and orthodontic tooth movement. **Molecules and Cells**, v. 32, n. 2, p. 189–196, 2011.

CHEN, X.; NING, L.; YANG, L.; LIU, J.; CHEN, J.; LIU, H. Expression of collagen I, collagen III and MMP-1 on the tension side of distracted tooth using periodontal ligament distraction osteogenesis in beagle dogs. **Archives of oral biology**, v.59, p. 217-25, 2014.

CONSOLARO, A. Controvérsias Tensão nas áreas de compressão do ligamento periodontal durante o movimento ortodôntico. E os binômios ? **Rev. clín. ortodon. Dental Press**, v. 6, n. 3, p. 107–111, 2007.

CONSOLARO, R. B. **Análise do complexo dentinopulpar em dentes submetidos à movimentação dentária induzida em ratos**. 2005.

DALCICO R. et al. Mechanisms of simvastatin in experimental periodontal disease. **J Periodontol**, v. 84, n. 8, p. 1145-1157, ago. 2013.

DANNEMANN C.; GRATZ K.W.; RIENER M.O.; ZWAHLEN R.A. Jaw osteonecrosis related to bisphosphonate therapy a severe secondary disorder. **Bone**, v. 40, p.828-34, 2007.

DATTA, H. K.; NG, W. F.; WALKER, J. A.; TUCK, S. P.; VARANASI, S. S. **The cell biology of bone metabolism. Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 5, p. 577–587, 2008.

DOLCI, G. S.; PORTELA, L. V.; ONOFRE DE SOUZA, D.; MEDEIROS FOSSATI, A. C. Atorvastatin-induced osteoclast inhibition reduces orthodontic relapse. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, 2017.

DUTRA, C.S. **Efeito da dipirona sódica na remodelação óssea da movimentação dentária induzida em ratos**. 2011. 96 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica)- Faculdade de Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará: Ceará. 2011.

FELLER, L; KHAMMISA. R.A.G; SHECHTER, I.; THOMADAKIS, G.; FOURIE, J., LEMBRER, J. Biological events in periodontal ligament and alveolar bone associated with application of orthodontic forces. **The Scientific World Journal**, 2015.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, F. J.; CAÑIGRAL, A.; BALBONTÍN-AYALA, F.; GONZALO-ORDEN, J. M.; CARLOS, F. de; COBO, T.; FERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, J. P.; SÁNCHEZ-LASHERAS, F.; VEGA, J. A. Experimental evidence of pharmacological management of anchorage in Orthodontics: A systematic review. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v. 20, n. 5, p. 58–65, 2015.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, F. J.; LÓPEZ-CABALLO, J. L.; CAÑIGRAL, A.; MENÉNDEZ-DÍAZ, I.; BRIZUELA, A.; DE COS, F. J.; COBO, T.; VEGA, J. A. Osteoprotegerin and zoledronate bone effects during orthodontic tooth movement. **Orthodontics and Craniofacial Research**, v. 19, n. 1, p. 54–64, 2016.

FERREIRA JÚNIOR, A. E. C. **Avaliação da influência da terapia por infliximabe na cicatrização óssea de alvéolos dentários pós-exodontia em ratos**. 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2016.

FIELD, R.A. Ash and calcium as measures of bone in meat and bone mixtures. **Meat Science**, v. 55, n.3, p. 255-264, 2000.

FLEISH, H. Bisphosphonates: mechanisms of action. **Endocrine Reviews**, v.19, p. 80-100,1998.

FLORENCIO-SILVA, R.; SASSO, G. R. D. S.; SASSO-CERRI, E.; SIMÕES, M. J.; CERRI, P. S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**,2015.

FRACALOSSO, A.; SANTAMARIA JR, M.; CONSOLARO, M. F.; CONSOLARO, A. A movimentação dentária experimental em murinos: período de observação e plano dos cortes microscópicos. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**, v. 14, n. 1, p. 143–157, 2009.

FRANZONI, J. S.; SOARES, F. M. P.; ZANIBONI, E.; VEDOVELLO FILHO, M.; SANTAMARIA, M. P.; DOS SANTOS, G. M. T.; ESQUISATTO, M. A. M.; FELONATO, M.; MENDONÇA, F. A. S.; FRANZINI, C. M.; SANTAMARIA, M. Zoledronic acid and alendronate sodium and the implications in orthodontic movement. **Orthodontics and Craniofacial Research**, v. 20, n. 3, p. 164–169, 2017.

GAO, S. Y.; ZHENG, G. Sen; WANG, L.; LIANG, Y. J.; ZHANG, S. E.; LAO, X.; LI, K.; LIAO, G. Q. Zoledronate suppressed angiogenesis and osteogenesis by inhibiting osteoclasts formation and secretion of PDGF-BB. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–15, 2017.

GAUR, T.; LENGNER, C. J.; HOVHANNISYAN, H.; BHAT, R. A.; BODINE, P. V. N.; KOMM, B. S.; JAVED, A.; VAN WIJNEN, A. J.; STEIN, J. L.; STEIN, G. S.; LIAN, J. B. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 39, p. 33132–33140, 2005.

GHONEIMA, A. A.; ALLAM, E. S.; ZUNT, S. L.; WINDSOR, L. J. Bisphosphonates treatment and orthodontic considerations. **Orthodontics and Craniofacial Research**, n.13, p. 1-10, 2010.

GÓMEZ ESCOBAR, L. G.; GONZÁLEZ DEVIA, D. Posibles efectos adversos oculares de los bifosfonatos. Reporte de 2 casos. **Revista Colombiana de Reumatología**, v. 24, n. 1, p. 54–59, 2017.

GONÇALVES, D. C. et al. Infliximab attenuates inflammatory osteolysis in a model of periodontitis in Wistar rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 239, p. 442–453, 2014.

GRAVES, D.T.; OATES, T.; GARLET, G. P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. **Journal of Oral Microbiology**. v. 3, p. 1-15, 2011.

GRIMM, S.; WALTER, C.; PABST, A.; GOLDSCHMITT, J.; WEHRBEIN, H.; JACOBS, C. Effect of compressive loading and incubation with clodronate on the RANKL/OPG system of human osteoblasts. **Journal of Orofacial Orthopedics** v. 76, n. 6, p. 531–542, 2015.

HASHIMOTO, M.; HOTOKEZAKA, H.; SIRISOONTORN, I.; NAKANO, T.; ARITA, K.; TANAKA, M.; YOSHIDA, N. The effect of bone morphometric changes on orthodontic tooth movement in an osteoporotic animal model. **Angle Orthodontist**, v. 83, n. 5, p. 766–773, 2013.

HAYAMI T., KAPILA., Y.L.; KAPILA., S. Divergent upstream osteogenic events contribute to the differential modulatio of MG63 cell osteoblast differetiation by

MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3). **Matrix Biol.**, v.30, n.4, p.281-289, may., 2011

HELLER, I.J.; NANDA, R. Effect of metabolic alteration of periodontal fiber on orthodontic movement: an experimental study. **Am J Orthod.**, St. Louis, v. 75, n.3, p.239-57, mar, 1979.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem**, v. 29, p. 1349-53, 1981.

HUANG, H.; WANG, J.; ZHANG, Y.; ZHU, G.; LI, Y.-P.; PING, J.; CHEN, W. Bone resorption deficiency affects tooth root development in RANKL mutant mice due to attenuated IGF-1 signaling in radicular odontoblasts. **Bone**, 2017.

HUJA, S. S.; MASON, A.; FENELL, C. E.; MO, X.; HUENI, S.; D'ATRI, A. M.; FERNANDEZ, S. A. Effects of short-term zoledronic acid treatment on bone remodeling and healing at surgical sites in the maxilla and mandible of aged dogs. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 69, n. 2, p. 418–427, 2011.

JACOBS C., WALTER C.; ZIEBART T.; DIRKS I.; SCHRAMM S.; GRIMM S.; KRIEGER E.; WELIRBEIN H. Mechanical loading influences the effects of bisphosphonates on human periodontal ligament fibroblasts. **Clinical Oral Investigations**, v.19, n. 3, p. 699-708, 2015.

JAWAD, M.; HUSEIN, A.; ALAM, M.; HASSAN, R.; AZLINA, A.; SHAARI, R. Non-invasive techniques of low level laser and low intensity pulsed ultrasound therapy effects on bone remodeling during orthodontic tooth movement. **Tissue Engineering - Part A**, v. 20, p. S-66, 2014.

JIANG, C.; LI, Z.; QUAN, H.; XIAO, L.; ZHAO, J.; JIANG, C.; WANG, Y.; LIU, J.; GOU, Y.; AN, S.; HUANG, Y.; YU, W.; ZHANG, Y.; HE, W.; YI, Y.; CHEN, Y.; WANG, J. Osteoimmunology in orthodontic tooth movement. **Oral Diseases**, v. 21, n. 6, p. 694–704, 2015.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem. J.**, v.11, n.1, p. 447–455, 1979.

KHAJURIA, D.K.; RAZDAN R.; MAHAPATRA, D.R. Zoledronic acid in combination with alfacalcidol has additive effects on trabecular microarchitecture and mechanical properties in osteopenic ovariectomized rats. **J Orthop Sci**, v.19, n.4, p. 646-656, 2014.

KILKENNY C. et al. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. **J Pharmacol Pharmacother.**, v. 1, n. 2, p. 94-99, 2010.

KIM, T.; HANNA, A.; et al. RANKL expression in rat periodontal ligament subjected to a continuous orthodontic force. **Archives of Oral Biology**, v. 52, n. 3, p.244–250, 2007.

KIMMEL, D.B. Mechanism of action pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical application of nitrogen-containing bisphosphonates. **J Dent Res**, v. 86, n.11, p. 1022-33, nov, 2007.

KRAUSE, C.; KORCHYNSKYI, O.; DE ROOIJ, K.; WEIDAUER, S. E.; DE GORTER, D. J. J.; VAN BEZOOIJEN, R. L.; HATSELL, S.; ECONOMIDES, A. N.; MUELLER, T. D.; LÖWICK, C. W. G. M.; TEN DIJKE, P. Distinct modes of inhibition by Sclerostin on bone morphogenetic protein and Wnt signaling pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 53, p. 41614–41626, 2010.

KUIPER, J. W. P. et al. Zoledronate and pamidronate depress neutrophil functions and survival in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n.2, p. 532–539, 2012.

KURITA, B.M. **Atividade anti-inflamatória e antirreabsortiva óssea do ácido zoledrônico durante a movimentação dentária induzida em ratos**. 2017. 109f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Farmacologia) Faculdade de Medicina da universidade Federal do Ceará: Ceará, 2015.

KWACK, M.H.; SUNG Y. K.; CHUNG, E.J.; IM, J. S.; AHN, J.S; KIM, M.K; KIM, J. C. Dihydrotestosterone – inducible dickkopf 1 from balding dermal papilla cells causes apoptosis in follicular keratinocytes. **J Invest Dermatol**, v. 128, n. 2, p.262-9, 2008.

LI, B.; ZHANG, Y. H.; WANG, L. X.; LI, X.; ZHANG, X. D. rabbit periodontium under orthodontic force Experimental animals. **Genetics and molecular research**, v. 14, n. 4, p. 19382–19388, 2015.

LI, J.; TAN, J.; MARTINO, M. M.; LUI, K. O. Regulatory T-Cells: Potential Regulator of Tissue Repair and Regeneration. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. March, p. 585, 2018.

LIBRIZZI, Z.; KALAJZIC, Z.; CAMACHO, D.; YADAV, S.; NANDA, R.; URIBE, F. Comparison of the effects of three surgical techniques on the rate of orthodontic tooth movement in a rat model. **The Angle Orthodontist**, v. 87, n. 5, p. 717–724, 2017.

LIN, J. H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties **Bone**, v.18, n. 2, p.75-85, 1996.

LOTWALA, R.B.; GREENLEE; OTT, S.M.; HALL S.H; HUANG, G.J. Bisphosphonates as a risk factor for adverse orthodontic outcomes a retrospective cohort study. **American Journal of orthodontics and Dentofacial orthopedics**, v.142, n.5, p. 625-34, 2012.

LU H. et al. Effects of subchronic exposure to lead acetate and cadmium chloride on rat's bone: Ca and Pi contents, bone density, and histopathological evaluation. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 7, n. 2, p. 640-647, 2014.

LU J, DUAN Y, ZHANG, M, WU M, WANG Y. Expression of Wnt 3a, Wnt 10b, β -catenina and DKK1 in periodontium during orthodontic tooth movmente in rats. **Acta Odontologica Scandinavica**, 2015.

LULLIS, F et al. Prevention of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates. v. 34, n. 5, p. 2477-80, may,2014.

LYSENG-WILLIAMSON, K. A. Zoledronic Acid -A review of its use in breast cancer. **Drugs**, v. 68, n. 18, p. 2661-2682, 2008.

MARX R.E, SAWATARI Y., FORTIN M., BROUMAND V. Bisphosphonate - induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. **J Maxillofac Surg**, v.63, n.11, p.1567-75, 2005.

MARX, R.E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J Maxillofac Surg**, v.61, n. 9, p. 1115-7, 2003.

MATSUZAWA, H.; TORIYA, N.; NAKAO, Y.; KONNO-NAGASAKA, M.; ARAKAWA, T.; OKAYAMA, M.; MIZOGUCHI, I. Cementocyte cell death occurs in rat cellular cementum during orthodontic tooth movement. **Angle Orthodontist**, v. 87, n. 3, p. 416–422, 2017.

MEIKLE, M.C. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic toothmovement: 100 years after Carl Sandstedt. *The European Journal of Orthodontics*, v. 28, n. 3, p. 221–240, 2005.

MONTES, G.S.; JUNQUEIRA, L.C.U. **The use of the picrosirius-polarization method for the study of biopathology of collagen**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.86, n.03, p.1-11, 1991.

MOSS, D. W.; WHITBY, L. G. A simplified heat-inactivationmethod for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. **Clin Chim Acta**, v. 61, p. 63-71, 1975.

NAJEEB, S.; SIDDIQUI, F.; KHURSHID, Z.; ZOHAIB, S.; ZAFAR, M. S.; ANSARI, S. A. Effect of bisphosphonates on root resorption after tooth replantation – a systematic review. **Dental Traumatology**, v. 33, n. 2, p. 77–83, 2017.

NAKASHIMA, T; HAYASHI, M.; FUKUNAGA, T.; KURATA , K.; OH-HORA, M.; FENG, J.Q; BONEWALD, L. F; RODAMA, T; WUTZA, A; WAGNER, EF; PENNIGER, J.M.; TAKAYANAGI, H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. **Nat Med**, v. 17, n.10, p. 1231-4, sep, 2011.

NARIMIYA T., WADA S., KANZAKI, H.; ISHIKAWA M.; TSUGE A.; YAMAGUCHI Y.; NAKAMURA, Y. Orthodontic tensile strain induces angiogenesis via type IV collagen degradion by marix metalloproteinase-12. **J Periodont Res.**, v.52, p. 842-52, 2017.

NISHIYAMA, Y. et al. Changes in the spatial distribution of sclerostin in the osteocytic lacuno-canalicular system in alveolar bone due to orthodontic forces, as detected on multimodal confocal fluorescence imaging analyses. **Archiver of oral biology**, v.60, p. 45-54, 2015.

OLIVEIRA, C. C.; BRIZENO, L. A.; SOUSA, F. B.; MOTA, M. R.; ALVES, A. P. Osteonecrosis of the jaw induced by receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (Denosumab) - Review. **Medicina Oral Patologia Oral Cirurgia Bucal**, v. 21, n. 4, e431-e439, 2016.

ORIÁ, R. et al. Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histo-morfometria e autofluorescência. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 4, p. 425-434, 2003.

ORTEGA, A.J.; CAMPBELL, P.M.; HINTON R.; NAIDU A.; BUSCHANG P.H. Local application of zoledronate for maximum Anchorage during space closure. **American Journal of orthodontics and Dentofacial orthopedics**, v. 142, n.6, p.780-791, 2012.

PATNTIRANPONG., S.; SINGHATANADGIT., W.; CHANRUANGVANITE, C.; LAVANRATTANAKUL., K.; SATRAVAHA., Y. Zoledronic acid suppresses mineralization through direct cytotoxicity and osteoblast differentiation inhibition. **J Oral Pathol Med**, v. 41, n. 9, p. 713-720, out., 2012.

POELMANS, S.; CARELS, C.E.; The impact of bisphosphonates on orthodontic treatment. **Ned Tijdschr Tandheelk**, v. 119, n. 4, p. 186-90, april, 2012.

PELAZ, A et al. Epidemiology, pharmacology and clinical characterization of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. A retrospective study of 70 cases. pii: S0001-6514, v.14, 00158-7, oct, 2014.

RATH, N.C.; HUFF, G.R.; HUFF, E.W. BALOG, J.M. Factors regulating bone maturing and strength in poultry. **Poultry Science**. 79:1024-1032, 2000.

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. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 131, n. 3, p. 321-326, 2007.

RODAN, G.A; FLEISCH, H.A. Bisphosphonates: mechanisms of action. **J Clin Invest**, v. 97, n.12, p.2692-6, 1996.

ROGERS, M. J., GORDON, S., BENFORD, H. L., COXON, F. P., LUCKMAN, S. P., MONKKONEN, J., FRITH, J.C. Cellular and Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates. **Cancer**, v. 88, Suppl. 12, p. 2961-2978, 2000.

RUGGIERO S.L.; MEROTRA, B., ROSENBERG T.J. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: A review of 63 cases. **J Maxillofac Surg**, v.62, p. 527-34, 2004.

RUGGIERO, S.L; FANTASIA, J.; CARLSON, E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and

management. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.102, n.4, p.433-41,2006.

SANTAMARIA JR. **Biologia da movimentação dentária induzida e das reabsorções radiculares associadas. Influência do gênero e dos bisfosfonatos**. 2009. 117 f. Tese (Doutorado) Faculdade de odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

SEIFI, M.; ASEFI, S.; HATAMIFARD, G.; LOTFI, A. Effect of local injection of Zolena , zoledronic acid made in Iran , on orthodontic tooth movement and root and bone resorption in rats. **Tabriz University of Medical Sciences**, v. 11, n. 4, p. 257–264, 2017.

SILVA, P. G. B.; FERREIRA Jr. A. E.; TEÓFILO, C. R.; BARBOSA, M. C.; LIMA Jr, R.C.; SOUSA, F. B.; MOTA, M. R.; RIBEIRO, R. A.; ALVES, A. P. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Archives of Oral Biology**, v. 60, p. 1237-1245, 2015.

SIRISOONTORN, I.; HOTOKEZAKA, H.; HASHIMOTO, M.; GONZALES, C.; LUPPANAPORNLARP, S.; DARENDELILER, M. A.; YOSHIDA, N. Orthodontic tooth movement and root resorption in ovariectomized rats treated by systemic administration of zoledronic acid. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 141, n. 5, p. 563–573, 2012.

SOARES, A. P.; KNOP, L. A. H.; JESUS, A. A. De; ARAÚJO, T. M. De. Células-tronco em odontologia. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 12, n. 1, p. 33–40, 2007.

SUZUKI, S. S.; GARCEZ, A. S.; SUZUKI, H.; ERVOLINO, E.; MOON, W.; RIBEIRO, M. S. Low-level laser therapy stimulates bone metabolism and inhibits root resorption during tooth movement in a rodent model. **Journal of Biophotonics**, v. 9, n. 11–12, p. 1222–1235, 2016.

TADDEI, S.R.D.A.; MOURA, A.P.; et al. Experimental model of tooth movement in mice: A standardized protocol for studying bone remodeling under compression and tensile strains. **Journal of Biomechanics**, v. 45, n. 16, p. 2729–2735, 2012.

TANG Y, ZHOU X, GAO B, XU X, SUN J, CHENG L et al. Modulation of Wnt/ β -catenina signaling attenuates periapical bone lesions. **J Dent Res**, v. 93, p. 175-82, 2014.

TEITELBAUM, S. L.; ROSS, F. P. Genetic regulation of osteoclast development and function. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 8, p. 638–649, 2003.

TYROVOLA, J.B.; PERREA, D.; et al. Relation of soluble RANKL and osteoprotegerin levels in blood and gingival crevicular fluid to the degree of root resorption after orthodontic tooth movement. **Journal of oral science**, v. 52, n. 2, p. 299–311, 2010.

TYROVOLA, J.B.; SPYROPOULOS, M.N.; et al. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. *Journal of oral science*, v. 50, n. 4, p. 367–376, 2008.

UDA, Y.; AZAB, E.; SUN, N.; SHI, C.; PAJEVIC, P. D. Osteocyte Mechanobiology. **Current Osteoporosis Reports**, v. 15, n. 4, p. 318–325, 2017.

VASCONCELLOS, D. V.; DUARTE, M. E. L.; MAIA, R. C. Efeito Anti-Tumoral dos Bisfosfonatos : uma Nova Perspectiva Terapêutica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 1, p. 45–54, 2004.

WOO, S. B.; HELLSTEIN, J. W.; KALMAR, J. R. Systematic Review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, n. 10, p. 753-761, 2006.

WU, Q.; ZHOU, X.; HUANG, D.; JI, Y.; KANG, F. IL-6 enhances osteocyte-mediated osteoclastogenesis by promoting JAK2 and RANKL activity in vitro. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 1360–1369, 2017.

YAMAGUCHI, M.; AIHARA, N.; et al. RANKL increase in compressed periodontalligament cells from root resorption. *Journal of dental research*, v. 85, n. 8, p. 751– 756, 2006.

YAMAGUCHI, Y. RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. **Orthod Craniofac Res**, v.12, p. 113-9, 2009.

YANG, J.; FIZAZI, K.; PELEG, S.; SIKES, C. R.; RAYMOND, A. K.; JAMAL, N.; HU, M.; OLIVE, M.; MARTINEZ, L. A.; WOOD, C. G.; LOGOTHETIS, C. J.; KARSENTY, G.; NAVONE, N. M. Prostate cancer cells induce osteoblast differentiation through a Cbfa1-dependent pathway. **Cancer Res**, v. 61, n. 14, p. 5652–5659, 2001.

ZAHROWSKI, J. J. Bisphosphonate treatment: An orthodontic concern calling for a proactive approach. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, 2007, v.131, n.3, p.311-20, 2007.

ZAHROWSKI, J. J. Optimizing orthodontic treatment in patients taking bisphosphonates for osteoporosis. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, 2009.



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DO METABOLISMO ÓSSEO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA EM RATOS SOBRE A INFLUÊNCIA DO ÁCIDO ZOLENDRÔNICO", protocolo nº 95/2015, sob responsabilidade da Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 24 de maio de 2016

Vigência do projeto	01/06/2016 a 01/12/2017
Espécie/Linhagem	Ratos heterogênicos Wistar
Nº de Animais	72
Peso/Idade	220g / 70 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 24 de maio de 2016

Prof. Dr. Rodrigo Siqueira
Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siape: 1520734



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 – Rodolfo Teófilo
Cep: 60430970 Fortaleza – CE

CERTIFICADO

Certificamos que o **ADENDO** ao projeto intitulado “**Avaliação do metabolismo ósseo em um modelo experimental de movimentação dentária em ratos sobre a influência do ácido zoledrônico**”, protocolo 95/15, sob responsabilidade da Prof. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização, pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião no dia 30 de maio de 2018.

Vigência do projeto	01/06/2018 – 01/08/2018
Espécie/Linhagem	Rato <i>Wistar</i>
Nº de Animais	45
Peso	220 g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 04 de junho de 2018.

Alexandre Havt Bindá

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador da CEUA-UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
ALEXANDRE HAVT BINDÁ

COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 1406382