



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA ODONTOLÓGICA
CURSO DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

CAIO DE SANTIAGO DUTRA

**EFEITO DA DAPIRONA SÓDICA NA REMODELAÇÃO ÓSSEA PELA
MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS**

FORTALEZA

2011

CAIO DE SANTIAGO DUTRA

**EFEITO DA DAPIRONA SÓDICA NA REMODELAÇÃO ÓSSEA PELA
MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Vilma de Lima

FORTALEZA

2011

D974e Dutra, Caio de Santiago

Efeito da dipirona sódica na remodelação óssea pela movimentação dentária induzida em ratos / Caio de Santiago Dutra. – Fortaleza-Ce, 2011.

132 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Vilma de Lima

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Odontologia; Fortaleza-Ce, 2011

1. Ortodontia 2. Dipirona 3. Remodelação Óssea I. Lima, Vilma de (Orient.) II. Título.

CDD: 617.643

CAIO DE SANTIAGO DUTRA

**EFEITO DA DIPIRONA SÓDICA NA REMODELAÇÃO ÓSSEA PELA
MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia Área de concentração em Clínica Odontológica.

Aprovada em 25/02/2011

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Sérgio Luis da Silva Pereira
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Prof^a. Dr^a. Cristiane Sá Roriz Fonteles
Universidade Federal do Ceará-UFC

***Dedico esta obra à Paula, pelo
amor, incondicionalidade e
estímulo irrestrito ao caminhar.***

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus pela sabedoria e força em todos os momentos de minha vida. Por iluminar e guiar o meu caminho e me presentear com uma família maravilhosa.

Aos meus queridos pais, Velma e Marco Aurélio, pelo amor e educação; ao meu irmão Felipe e minha irmã Virna, pelo apoio e compreensão em todos os momentos de minha vida.

À Paula Goes Pinheiro Dutra, pela colaboração e ajuda indispensáveis nesta pesquisa. Suas contribuições na elaboração do projeto e na fase experimental foram de fundamental importância para o andamento deste trabalho. Serei sempre grato pelos seus ensinamentos e sua dedicação.

A minha orientadora Vilma de Lima, pela amizade, confiança e oportunidade em realizar este trabalho. Por mais que expresse, minhas palavras não seriam capazes de traduzir a gratidão e o respeito que tenho pela sua pessoa. Pela enorme contribuição à minha formação profissional e incentivo ao longo deste período.

À Valéria Goes Pinheiro, por todo apoio, sabedoria, e acima de tudo por sempre me incentivar tanto na vida acadêmica quanto na vida pessoal.

***A vida é feita de decisões, erros e acertos.
Cabe a nós tirarmos de cada decisão a
experiência para nos tornarmos seres
humanos um pouco melhores a cada dia; isto
é ser feliz !***

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra. Vilma de Lima por todo empenho, sabedoria, compreensão, exigência e acima de tudo por sempre me incentivar tanto na vida acadêmica quanto pessoal.

À professora Norma Maria Barros Benevides, do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, por sua inestimável contribuição na realização de diversas fases desse estudo.

Aos professores Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar, Dra. Gerly Anne de Castro Brito e Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, pela pronta cessão de seus espaços laboratoriais no Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

Aos professores dos Programas de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) e Farmacologia (PPGFF), que muito contribuíram em minha formação acadêmica.

Aos meus colegas do Laboratório de Farmacologia Oral, doutorandas Paula Goes e Ana Patrícia Souza de Lima, a mestranda Iracema Matos de Melo, e o aluno de iniciação científica Pedro Henrique Accioly, pela colaboração em vários experimentos, e à estudante de iniciação científica, Luciana Cândido, por suas colaborações voluntárias junto ao nosso grupo de pós-graduandos.

À secretária do PPGO Lúcia Ribeiro, pela atenção prestada.

Aos bioteristas do Departamento de Fisiologia e Farmacologia Francisco Haroldo Pinheiro e Carlos Pereira de Oliveira pelos cuidados dos animais laboratoriais.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e, em seguida, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Projetos Renorbio e Universal) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes - Projeto Pró-equipamentos), pelo suporte financeiro a este estudo.

Em suma, a todos que, mesmo não citados aqui, de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

Avaliação da atividade da Dipirona na remodelação óssea pela movimentação dentária induzida em ratos. CAIO DE SANTIAGO DUTRA. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Odontologia do Departamento de Clínica Odontológica da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia. Aprovação em 25 de Fevereiro de 2011. Orientadora: Prof^a Dr^a Vilma de Lima.

Movimentação dentária induzida (MDI) é um processo inflamatório, que combina respostas patológicas e fisiológicas a forças aplicadas aos dentes. Um dos principais mediadores responsáveis pela MDI é a Prostaglandina que também relaciona-se à eventos álgicos. Paracetamol (PAR) e Dipirona Sódica (DIP) são fármacos analgésicos que não interferem significativamente em mediadores inflamatórios periféricos. Sabendo que o PAR não interfere no processo de remodelação óssea durante a MDI, parece-nos razoável avaliar o efeito da DIP no processo de remodelação óssea. Assim o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da DIP na remodelação óssea utilizando o modelo de MDI em ratos *Wistar* machos distribuídos em grupos: Salina (SAL=2 ml/kg), Paracetamol (PAR 200 mg/kg) e Dipirona sódica dividido em 3 subgrupos (DIP 25; 75 ou 225 mg/kg), administrados por via oral, diariamente 30 min antes da instalação do dispositivo ortodôntico entre o 1º molar superior esquerdo e os incisivos durante 4 dias, quando, então, foram sacrificados e os seguintes parâmetros avaliados: 1) Análises microscópicas do periodonto através de: a) estudos histológico semi-quantitativo, morfométrico e marcação imunohistoquímica para TRAP; b) análises da atividade da mieloperoxidase (MPO) gengival; 2) Dosagem sérica de Fosfatase Alcalina Óssea (FAO); e 3) Avaliação sistêmica através de: a) leucograma; b) dosagens séricas de TGO e TGP e c) variação de massa corpórea. Os animais submetidos a 4 dias de MDI apresentaram áreas hialinas extensas, espessura de ligamento periodontal diminuída e tecido ósseo frontal irregular [Mediana: 3 (2-3)], quando comparado ao grupo Normal [0 (0-0)] ($p < 0,05$). O tratamento com PAR [3 (0-3)] foi histologicamente semelhante a SAL. DIP não reverteu os achados histológicos [DIP 25=3 (0-3); DIP 75=3 (3-3); DIP 225=3 (2-3)] quando comparados aos controles SAL e PAR. O grupo SAL apresentou percentual de áreas hialínicas de $12,5 \pm 0,9\%$, diferente do grupo Normal (0%) ($p < 0,05$), porém semelhante aos grupos tratados com PAR ($12,2 \pm 1,2\%$) e DIP (25= $10,7 \pm 0,7\%$; 75= $11,0 \pm 0,8\%$; 225= $10,8 \pm 1,0\%$). Todos os grupos experimentais apresentaram imunomarcagem positiva para TRAP. DIP não impediu o aumento da atividade de MPO quando comparado ao grupo Normal ($p < 0,05$), contudo causou redução significativa de MPO DIP (25= $48,9\%$; 75= $43,1\%$; 225= $43,5\%$) quando comparada à SAL ou PAR ($p < 0,05$). Todos os grupos apresentaram redução significativa dos níveis de FAO, SAL= $54,3\%$; PAR= $62,4\%$; DIP (25= $59,7\%$; 75= $76,1\%$; 225= $71,2\%$). O estudo hematológico mostrou leucocitose no 4ºd nos animais dos grupos SAL ($23,8 \pm 2,1$) e PAR ($22,3 \pm 2,1$), marcado por neutrofilia ($[7,5 \pm 1,2]$ e $[5,7 \pm 0,9]$). DIP reverteu a leucocitose DIP (25= $16,1 \pm 2,2$; 75= $16,7 \pm 1,4$; 225= $15,4 \pm 2,4$) reduzindo o número de neutrófilos ($p < 0,05$) DIP (25= $2,4 \pm 0,6$; 75= $3,1 \pm 0,6$; 225= $2,8 \pm 0,2$). Não houve diferença significativa de TGO ou TGP entre os grupos. DIP não reverteu a perda inicial de massa corpórea vista nos grupo SAL e PAR, no entanto houve tendência ao acompanhamento da curva de peso dos animais normais a partir do 3ºd Dessa forma os resultados deste estudo mostraram que a DIP não afetou a resposta inflamatória e a reabsorção óssea em ratos submetidos à MDI. Além disso, o tratamento com DIP não causou neutropenia, nem alterações em TGO e TGP, e não afetou significativamente a massa corporal, quando comparada a animais dos grupos SAL e PAR. Portanto, sugere-se que a DIP pode ser uma importante ferramenta farmacológica para o controle da dor após ativação ortodôntica sem afetar a movimentação dentária, ou causar riscos sistêmicos.

Palavras-chave: Movimentação dentária, Inflamação, Dipirona, Ratos

ABSTRACT

Evaluation of Dypirone activity on bone remodeling by orthodontic tooth movement in rats. CAIO DE SANTIAGO DUTRA. Dissertation presented to Dentistry Post-graduation course from Clinical Dentistry Department of Pharmacy, Dentistry and Nursing Faculty of Federal University of Ceará, as pre-requisite for Master Degree on Dentistry. Approved in February 25th of 2011. Supervisor: Prof. Dr. Vilma de Lima.

The orthodontic tooth movement (OTM) is an inflammatory process, that combines pathologic and physiologic answers to forces applied to teeth. One of the main mediators responsible by OTM is prostaglandin, which is also related to pain events. Paracetamol (PAR) and Sodium Dypirone (DYP) are analgesic drugs that do not interfere significantly in peripheral inflammatory mediators. Knowing that PAR does not interfere on bone remodeling process during OTM, it seems reasonable to evaluate the DYP effect on bone remodeling process. So, the aim of this study was to evaluate the DYP effect on bone remodeling process using OTM model in male *Wistar* rats, distributed in groups: Saline (SAL=2 ml/kg), Paracetamol (PAR 200 mg/kg) and Sodium Dypirone, which was divided in 3 subgroup (DIP 25; 75 or 225 mg/kg), given by oral gavage, daily 30 min before installation of orthodontic device between 1st left superior molar and incisive during 4 days, when, then, they were sacrificed and the following parameters were evaluated. 1) microscopic analyses of periodontium through: a) semi-quantitative histological study, morphometric study and immunohistochemical staining to TRAP; b) analyses of mieloperoxidase (MPO) activity in gingiva; 2) Serum dosage of Bone-specific Alkaline Phosphatase (BALP); and 3) Systemic evaluation through: a) leukogram; b) serum dosage of TGO and TGP and c) body mass weight variation. The animals submitted to 4 days of OTM presented large hyalin areas, reduced periodontal ligament thickness and irregular frontal bone tissue [Median: 3 (2-3)], when compared to Normal group ($p < 0.05$). The treatment with PAR [3 (0-3)] was histologically similar to SAL. DYP did not reverse the histological findings [DYP 25=3 (0-3); DYP 75=3 (3-3); DYP 225=3 (2-3)] when compared to controls SAL and PAR. The SAL group presented percentual of hyalin area by $12.5 \pm 0.9\%$, different from Normal group (0%) ($p < 0.05$), but it was similar to groups treated with PAR ($12.2 \pm 1.2\%$) and DYP (25= $10.7 \pm 0.7\%$; 75= $11.0 \pm 0.8\%$; 225= $10.8 \pm 1.0\%$). All experimental groups presented positive immunostaining to TRAP. DYP did not prevent the raise of MPO activity when compared to Normal group ($p < 0.05$), however it caused significant reduction of MPO, DYP (25= 48.9% ; 75= 43.1% ; 225= 43.5%) when compared to SAL or PAR ($p < 0.05$). All groups presented significant reduction of BALP serum levels, SAL= 54.3% ; PAR= 62.4% ; DYP (25= 59.7% ; 75= 76.1% ; 225= 71.2%). The hematological study showed leukocytosis on 4th day on animals of SAL group (23.8 ± 2.1) and PAR (22.3 ± 2.1), marked by neutrophilia ($[7.5 \pm 1.2]$ and $[5.7 \pm 0.9]$). DYP reversed leukocytosis DYP (25= 16.1 ± 2.2 ; 75= 16.7 ± 1.4 ; 225= 15.4 ± 2.4) reducing the number of neutrophils ($p < 0.05$) DYP (25= 2.4 ± 0.6 ; 75= 3.1 ± 0.6 ; 225= 2.8 ± 0.2). There was no significant difference on TGO or TGP serum levels between the groups. DYP did not reversed the initial loss of body weight seen on groups SAL and PAR, however there was a tendency on following the weight curve of normal animals from the 3rd day on. In this way, the results of this study revealed that DYP did not affect the inflammatory response and bone resorption in rats submitted to OTM. Besides, the treatment with DYP did not caused either neutropenia, or alterations in TGO and TGP, and it did not affect significantly the body mass weight, when compared to animals from SAL and PAR groups. Therefore, it is suggested that DYP can be an important pharmacological tool to pain control after orthodontic activation without interfere on tooth movement, or induce systemic risks.

Key words: Tooth movement, Inflammation, Dypirone, Rats

LISTA DE ABREVIATURAS

MAA	3-metil-amino-antipirina
AAA	4-acetil-amino-antipirina
AA	4-amino-antipirina
FAA	4-formil-amino-antipirina
COX	Ciclooxigenase
COL-I	Colágeno Tipo-I
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
TNF	Fator de necrose tumoral
M-CSF	Fator Estimulador de Crescimento de Colônia de Macrófagos
TRAP	Fosfatase Ácida Tártaro-Resistente
TIMP-1	Inibidores Teciduais de Metaloproteinase de Matriz
IL-1	Interleucina -1
IL-10	Interleucina -10
IL-6	Interleucina -6
IL-8	Interleucina -8
RANKL	Ligante de Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B
MDI	Movimentação dentária induzida
NMDA	N-metil-D-aspartato
OCN	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
APAP	p-Aminofenol
PGs	Prostaglandinas
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotografias da sequência de passos para a realização do modelo experimental de Movimentação Dentária Induzida (MDI) no primeiro molar superior esquerdo em rato.....	28
Figura 2: Representação esquemática do modelo de movimentação dentária induzida em ratos.	30
Figura 3: Fotomicrografia da área desafiada para análise histológica.....	31
Figura 4: Quantificação de áreas hialínicas.	34
Figura 5: Efeitos histológicos da MDI sobre o Ligamento Periodontal e Osso Alveolar nos grupos experimentais.	40
Figura 6: Fotomicrografias de corte transversal da raiz distovestibular de ratos submetidos a 4 dias de MDI (B) e em imagem aproximada (C e D) e de animais não submetidos a MDI com ligamento periodontal e osso alveolar normal (A).....	43
Figura 7: Fotomicrografias do periodonto normal de ratos: Normal (A), submetidos a MDI e que receberam salina (B), Paracetamol (200 mg/kg); Dipirona Sódica 25 mg/kg (D), 75 mg/kg (E) ou 225 mg/kg (F).....	46
Figura 8: Efeito da Dipirona (DIP) sobre a quantidade de áreas hialínicas na MDI	47
Figura 9: Fotomicrografias do da detecção imunohistoquímica de da expressão TRAP no tecido periodontal de ratos: Normal (A), submetidos a MDI e que receberam salina (B), Paracetamol (200 mg/kg); Dipirona Sódica 25 mg/kg (D), 75 mg/kg (E) ou 225 mg/kg (F)...	49
Figura 10: Efeito da Dipirona (DIP) sobre a quantidade de MPO/mg de tecido gengival após MDI.....	50
Figura 11: Efeito da Dipirona (DIP) sobre os níveis séricos de FAO antes e após MDI.....	52
Figura 12: Efeito da Dipirona (DIP) sobre o leucograma dos ratos submetidos a MDI.	54
Figura 13: Efeito da Dipirona (DIP) sobre os níveis séricos de TGO (A) e TGP (B) antes e após MDI.....	56
Figura 14: Efeito da Dipirona (DIP) sobre os níveis séricos de TGP antes e após MDI.	58

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Aspectos teciduais e celulares para avaliação microscópica no lado de compressão do ligamento periodontal.	33
Tabela 1: Análise histológica semi-quantitativa das raízes distovestibular, distolingual e intermediária do primeiro molar superior esquerdo de rato submetido a MDI.	42
Tabela 2: Análise histológica semi-quantitativa dos efeitos da Dipirona Sódica nas raízes distovestibular, distolingual e intermediária do primeiro molar superior esquerdo de rato submetido a MDI.	45

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	08
LISTA DE ABREVIATURAS.....	09
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE QUADROS E TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Movimentação Dentária Induzida (MDI)	14
1.2. Movimentação Dentária Induzida Experimental.....	17
1.3. Fármacos utilizados.....	18
1.3.1. Paracetamol (Acetaminofeno).....	18
1.3.2. Dipirona Sódica.....	20
1.4. JUSTIFICATIVA.....	23
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. Seleção de animais.....	25
3.2. Aparelhos, Instrumentos Laboratoriais, Materiais de Consumo e Software.....	26
3.3. Drogas, soluções e corantes utilizados.....	26
3.2. Protocolo Experimental.....	27
3.2.1 Modelo de Movimentação Dentária Induzida Experimental.....	27
3.2.1.1 Preparo do Aparelho Ortodôntico.....	27
3.2.1.2 Anestesia, Instalação e Ativação do Aparelho Ortodôntico.....	27
3.2.2. Grupos Experimentais.....	29
A. Grupos Controle – Salina.....	29
B. Grupos Controle Positivo – Paracetamol.....	29
C. Grupo tratado com Dipirona Sódica.....	29
3.3. Parâmetros avaliados na MDI Experimental.....	29
3.3.1. Análise histológica da estrutura do periodonto.....	31
A. Análise histológica.....	31
A.1. Análise Histológica Semi-quantitativa.....	32
A.2 Análise histomorfométrica.....	32
A.3 Marcação imunohistoquímica de TRAP.....	35
B. Análises Bioquímicas.....	36
B.1 Análise da atividade da mieloperoxidase gengival.....	36
B.2 Dosagem de Fosfatase Alcalina Óssea.....	37
C. Análise dos parâmetros sistêmicos.....	37
C.1 Estudo hematológico.....	37
C.2 Dosagens séricas de TGO e TGP.....	38
C.3 Avaliação da variação de massa corpórea.....	38
3.4. Aspectos éticos.....	38

3.5. Análise estatística.....	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1. Movimentação Dentária Induzida em Ratos.....	39
4.1.1.Parâmetros locais do Ligamento Periodontal e Osso Alveolar.....	39
A. Efeitos da MDI sobre o Ligamento Periodontal (LP) e Osso Alveolar nos grupos experimentais.....	39
B. Efeitos histológicos da MDI sobre o Ligamento Periodontal e Osso Alveolar nos grupos experimentais.....	41
C. Efeito da Dipirona Sódica (DIP) sobre ligamento periodontal e osso alveolar submetidos a MDI.....	44
D. Análise Histomorfométrica.....	47
E. Marcação Imunohistoquímica para TRAP.....	48
4.1.2. Parâmetros Bioquímicos dos ratos submetidos a MDI.....	48
A. Dosagem da mieloperoxidase gengiva.....	48
B. Efeito da Dipirona Sódica (DIP) sobre o metabolismo ósseo.....	51
B.1. Dosagem Sérica de Fosfatase Alcalina Óssea (FAO).....	51
4.1.3. Parâmetros Sistêmicos dos ratos submetidos a MDI.....	53
A. Efeito da Dipirona Sódica (DIP) sobre o Leucograma dos Ratos submetidos a MDI.....	53
B. Efeito da Dipirona Sódica (DIP) sobre as Enzimas Hepáticas dos Ratos submetidos a MDI.....	55
B.1. Transaminase Glutâmico Oxalacética – TGO.....	55
B.2. Transaminase Glutâmico Pirúvica – TGP.....	55
C. Efeito da Dipirona Sódica (DIP) sobre a Variação de Massa Corpórea dos Ratos submetidos a MDI.....	59
5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÃO.....	72
7. REFERENCIAS.....	73
8. ANEXO.....	98

1. INTRODUÇÃO

1.1. Movimentação Dentária Induzida (MDI)

Movimentação dentária induzida (MDI) é um processo que combina respostas patológicas e fisiológicas a forças aplicadas externamente aos dentes. Clinicamente este processo consiste em três fases, onde inicialmente há um deslocamento dentário instantâneo; posteriormente ocorre ausência de movimentação dentária visível, sendo, então, seguida por um período de movimentação linear (Wise & King, 2008).

O processo de MDI envolve simultaneamente o ligamento periodontal e o osso alveolar, onde as células e a matriz extracelular do ligamento periodontal irão produzir e liberar substâncias que participarão da remodelação óssea durante a MDI (Krishnan & Davidovitch, 2006a). O principal mecanismo celular que regula a remodelação do tecido ósseo submetido à carga mecânica é conhecido como mecanotransdução, onde células ósseas convertem sinais mecânicos em químicos e/ou elétricos através da energia mecânica gerada pelo movimento do fluido intersticial (Burger & Klein-Nulend, 1999). Os osteócitos são as células mecano-sensíveis do tecido ósseo capazes de responder ao estresse mecânico por meio da liberação de moléculas sinalizadoras (Klein-Nulend *et al.*, 1995).

A inflamação é um importante co-requisito para a MDI. A ativação de células inflamatórias e a conseqüente liberação de mediadores apresentam importante função sobre os tecidos mineralizados (Lara *et al.*, 2003). A fase inicial da movimentação dentária estimula a liberação de fatores químicos e elétricos das fibras nervosas sensoriais e desencadeiam resposta inflamatória que modifica a microcirculação, promovendo vasodilatação periodontal acompanhada por migração de leucócitos a partir dos capilares sanguíneos (Perinetti *et al.*, 2002). Células endoteliais são reconhecidas como células mecano-sensoriais e respondem a variações de fluxo sanguíneo com a liberação de mediadores inflamatórios a fim de manter constante o tônus muscular e controlar a pressão arterial (Hecker *et al.*, 1993). Portanto, mecanismos inflamatórios necessitam ser considerados em associação com a mecanotransdução esquelética para um completo entendimento da MDI (Wise & King, 2008).

A aplicação de força produz reações teciduais que estão associadas tanto a fatores locais relacionados aos dentes, quanto a fatores sistêmicos relacionados

ao metabolismo ósseo (Verna & Melsen, 2003). A MDI é primariamente mediada pela reabsorção óssea na área de compressão do ligamento periodontal e pela deposição óssea na área de tensão (Krishnan & Davidovitch, 2006a; Silveira *et al.*, 2006). No lado de pressão do ligamento periodontal ocorre afrouxamento de fibras periodontais e o tecido ósseo assume uma superfície convexa, enquanto que no lado de tensão, o estiramento das fibras periodontais gera uma ligeira curvatura da parede alveolar que assume uma forma côncava (Krishnan & Davidovitch, 2006a).

Eventos inflamatórios iniciais em locais de compressão são causados pela constrição da microcirculação do ligamento periodontal resultando em necrose focal, a qual se apresenta histologicamente como áreas de hialinização, além de hiperemia compensatória em ligamento periodontal adjacente. Estes sítios necróticos liberam vários mediadores quimioatraentes para células fagocíticas multinucleadas, positivas para o marcador Fosfatase Ácida Tártaro-Resistente (TRAP, do inglês *Tartrate-Resistant Acid Phosphatase*), as quais promovem reabsorção de ligamento periodontal necrótico, bem como de tecido ósseo e cimento adjacentes (Wise & King, 2008). Osteoclastos são então recrutados, porém a movimentação dentária se mantém impedida até que o tecido necrótico seja inteiramente removido, caracterizando a segunda fase da movimentação dentária. Concomitantemente, ocorre a deposição de novo cimento e osso nas proximidades dos locais de reabsorção (Wise & King, 2008).

Vários estudos têm demonstrado a associação entre a liberação de citocinas pró-inflamatórias e enzimas lisossomiais com a promoção da reabsorção tecidual. Prostaglandinas (PGs) (Ren & Vissink, 2008), Interleucinas (IL)-1 (Bletsa *et al.*, 2006; Ren & Vissink 2008; Giannopoulou *et al.*, 2008), IL-8 (Giannopoulou *et al.*, 2008), IL-6, Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) (Kaku *et al.*, 2008) e Fator Estimulador de Crescimento de Colônia de Macrófagos (M-CSF) (Kaku *et al.*, 2008), catepsina B (Sugiyama *et al.*, 2003), Fator de Necrose Tumoral (TNF) (Bletsa *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 2007), Ligante de Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B (RANKL) (Yamaguchi *et al.*, 2006, 2009), além de marcação positiva para Fosfatase Ácida Tartáreo-Resistente (TRAP) (Jäger *et al.*, 2005; Gameiro *et al.*, 2008), bem como altos níveis de fosfatase ácida em fluido crevicular gengival (Perinetti *et al.*, 2002; Batra *et al.*, 2006) são, com freqüência, encontrados em zonas de compressão da movimentação dentária induzida .

Sítios de tensão durante MDI têm sido caracterizados por serem primariamente osteogênicos, desprovidos de componentes inflamatórios significantes. Forças de baixa magnitude têm apresentado um padrão, em geral, antiinflamatório e indutor de sinal anabólico. Alguns estudos têm corroborado estes achados demonstrando que o lado de tensão apresenta maior expressão de IL-10, Inibidores Teciduais de Metaloproteinase de Matriz (TIMP-1), Colágeno Tipo-I (COL-I), Osteoprotegerina (OPG) e Osteocalcina (OCN) (Garlet *et al.*, 2007; Garlet. *et al.*, 2008).

Diversos estudos propõem um papel para o óxido nítrico (NO) como uma molécula sinalizadora da mecanotransdução durante o movimento ortodôntico (Akin *et al.*, 2004; Yoo *et al.*, 2004). O óxido nítrico é um importante sinalizador ósseo que está envolvido em muitos processos pato-fisiológicos, sendo produzido a partir do aminoácido L-arginina pela ação da enzima Óxido Nítrico Sintetase (NOS) (Van't Hof, 2001). Mais recentemente, tem sido demonstrado aumento na produção de NOS após aplicação de força mecânica em animais e humanos, e os achados imunohistoquímicos sugerem que o NO pode ser um regulador-chave na movimentação dentária induzida por regular a função dos osteoblastos e osteoclastos, modulando o metabolismo ósseo (Shirazi *et al.*, 2002). Nesse contexto, o NO é considerado um inibidor de reabsorção óssea que atua suprimindo a expressão de Ligante de Receptor Ativador do Fator Nuclear- κ B (RANKL) e aumentando a expressão de Osteoprotegerina (OPG) em células ósseas, reduzindo a formação e atividade de osteoclastos (Fan *et al.*, 2004).

Dentre os diversos mediadores atuantes no processo de MDI, destacam-se de forma interessante as Prostaglandinas (PGs), produtos finais do metabolismo dos ácidos graxos produzidos pela via da ciclooxigenase (COX). Sabe-se que estes mediadores podem apresentar características fisiológicas e patológicas implicadas em várias áreas terapêuticas de interesse como na resposta inflamatória e reabsorção óssea (Rao & Knaus, 2008). Estudos sobre MDI têm se mostrado capazes de identificar o papel das PGs em processos reabsortivos, visto que níveis aumentados de PGE₂ foram capazes de suprimir a expressão fisiológica de osteoprotegerina (OPG), desequilibrando o eixo RANK-RANKL-OPG a favor da osteoclastogênese (Tyrovola *et al.*, 2008). Além disso, a maior concentração de prostaglandina em sítios de movimentação dentária induzida tem sido associada a eventos hiperálgicos (Krishnan & Davidovitch, 2006b). Estes últimos vêm ganhando

destaque especial, pois estudos têm mostrado que a dor é uma condição frequente em indivíduos submetidos a tratamento ortodôntico, sendo considerada a principal causa de descontinuação do tratamento (Krishnan, 2007).

1.2. Movimentação Dentária Induzida Experimental

Apesar da extensa literatura e da grande experiência de profissionais da ortodontia sobre movimentação de dentes através da aplicação de forças, pouco se sabe sobre o mecanismo básico que permeia este processo, o qual correlaciona a aplicação de um sistema de força a reações teciduais. Assim, é necessária a utilização de um sistema de força padronizado e reproduzível associado à descrição das propriedades morfológicas e biomecânicas dos elementos dentários e estruturas vizinhas (Ren *et al.*, 2004).

Uma grande variedade de espécies como ratos, cães, gatos e macacos têm sido utilizadas como modelo animal para o melhor entendimento das repostas biológicas teciduais às forças ortodônticas. Dentre estes, os ratos têm sido considerados bons modelos para estudos da movimentação dentária, pois apresentam baixo custo e favorecem a obtenção de um maior tamanho amostral, dentre outras vantagens. Adicionalmente, o preparo para análises histológicas é relativamente fácil, e a maior parte dos anticorpos necessários para as técnicas de biologia molecular e celular estão disponíveis para estes animais (Ren *et al.*, 2004).

Existem algumas maneiras de se obter a movimentação dentária induzida em ratos, como, por exemplo, através da colocação de elásticos de poliuretano (Ren *et al.*, 2004) ou utilizando molas fechadas de níquel titânio (Heller & Nanda, 1979; Ren *et al.*, 2004). Estas últimas têm sido bastante indicadas, pois são mais estáveis e simples de manusear, além de permitir distribuição da força de maneira contínua e controlada por um período maior de tempo (Ren *et al.*, 2004). Os modelos de movimentação dentária induzida em ratos devem levar em consideração, ainda, as fases de movimentação dentária que ocorrem clinicamente (Proffit & Fields, 2000). Poucos dias ou semanas podem ser necessários para o alcance da etapa de movimentação da chamada fase linear, onde se descrevem as repostas biológicas e as características da real movimentação dentária em osso. Estudos mostram que esta fase é atingida após duas semanas de movimentação com força contínua e constante (Ren *et al.*, 2004).

Neste sentido, estudos demonstraram que o modelo de movimentação dentária induzida em ratos por mola fechada de níquel titânio reproduz as principais características da movimentação dentária em humanos, observando-se pico de reabsorção óssea alveolar a partir do quarto dia experimental (*Costa et al.*, 2006), seguida por uma fase de ausência de movimentação dentária por volta do 7º dia, e culminando em movimentação dentária real no 14º dia experimental (*da Silva et al.*, 2006). Esse modelo propicia uma maneira de avaliação das bases biológicas para a movimentação dentária. Tal observação tem incentivado a avaliação de abordagens farmacológicas para as quais ainda não existe um consenso em sua utilização clínica.

1.3. Fármacos utilizados

1.3.1. Paracetamol (Acetaminofeno)

O ácido acético e *p*-aminofenol ou APAP, comumente conhecido como Acetaminofeno, nos Estados Unidos, ou Paracetamol, no Brasil, é um analgésico não-opióide geralmente usado para o controle da dor leve a moderada (*Mehlich*, 2002). O Paracetamol é uma das mais populares drogas utilizadas para controle da febre e da dor. Diferentemente dos AINES, não têm nenhuma atividade antiinflamatória e não produz danos gastrointestinais ou efeitos cardiorenais deletérios (*Bertolini et al.* 2006). Estudos têm mostrado que este agente encontra-se entre os fármacos mais vendidos dos Estados Unidos (*Jones*, 2002; *Sach*, 2005).

A ação farmacológica do Paracetamol tem se mostrado tanto analgésica quanto antipirética, com curto período de latência. Embora seu mecanismo de ação ainda não esteja completamente compreendido, sabe-se, contudo, que possivelmente o efeito analgésico do Paracetamol inclui a inibição das vias de óxido nítrico, e a reversão da hiperalgisia induzida por N-metil-D-aspartato (NMDA) ou substância P. Sabe-se, ainda, que o Paracetamol é um pobre inibidor da síntese de prostaglandinas via ciclooxigenase (COX)-1 ou COX-2 e, portanto, ao contrário dos anti-inflamatórios não-esteroidais, apresenta fraca ação anti-inflamatória. Mais recentemente, estudos têm demonstrado que a capacidade de analgésicos não opióides, dentre eles, o Paracetamol, envolve a inibição da isoforma da ciclooxigenase 3 (COX-3), parte da COX-1 constitutiva predominantemente presente

ao nível central, o que explica a eficácia antitérmica do Paracetamol, bem como sua analgesia (Chandrasekharan *et al.*, 2002).

Outros trabalhos demonstram uma possibilidade adicional ao mecanismo de ação do Paracetamol. Sugere-se que este agente estaria relacionado aos receptores canabinóides que são capazes de produzir analgesia em modelos de dor em animais e participam do controle basal do limiar nociceptivo. Os canabinóides também produzem efeito antinociceptivo onde o receptor CB₁ está quase que exclusivamente envolvido. Dados experimentais sugerem que a antinocicepção do Paracetamol está envolvida com a rede de opióides do Sistema Nervoso Central (SNC) através do receptor-K, que é um dos receptores em que os canabinóides se ligam para produzir efeito antinociceptivo. Em experimento com ratos, utilizando o teste da Placa Quente, a administração de um antagonista para o receptor CB₁ previamente à administração de Paracetamol e de um agonista seletivo para o receptor CB₁ foi capaz de impedir completamente a atividade analgésica deste fármaco na dose de 1000 mg/kg; i.p. (Bertolini *et al.* 2006).

Em geral, o Paracetamol tem-se mostrado seguro quando utilizado para o controle da dor aguda, muito embora, altas doses tenham estado associadas com casos de hepatotoxicidade (Mehlich, 2002). Em estudos utilizando o teste “*tail flick*” em ratos observou-se que doses de 25 a 100 mg/kg; v.o. foram capazes de interferir no limiar nociceptivo durante os testes, de maneira dose-resposta (Bianchi *et al.*, 1996). Posteriormente, verificou-se que o Paracetamol na dose de 400 mg/kg; v.o. alterou o limiar antinociceptivo em ratos (Bujalska, 2004), e mais recentemente, o Paracetamol (60, 180 e 360 mg/kg; v.o.) foi igualmente capaz de aumentar o limiar antinociceptivo, de maneira dose-resposta (Rezende *et al.*, 2008).

O processo biológico que envolve a MDI envolve a liberação de diversos mediadores inflamatórios como prostaglandinas (PG), as quais apresentam importante função na remodelação óssea induzida por estresse mecânico. A PGE₂ estimula a formação óssea lamelar, diminui a síntese de colágeno e aumenta o AMPc, acelerando o índice de MDI (Kohno *et al.*, 2003)

Em Odontologia, o Paracetamol tem sido amplamente utilizado como agente analgésico, com destaque no campo da ortodontia, visto que o desconforto causado pela ativação do aparelho durante tratamento ortodôntico tem sido queixa frequente. Adicionalmente, estudos vêm mostrando que o uso de Paracetamol, apesar de sua ação analgésica, não é capaz de interferir nos eventos inflamatórios

que regem a movimentação ortodôntica (Salmassian *et al.*, 2009), pois devido à fraca inibição de prostaglandinas periféricas, o Paracetamol não interfere na inibição de osteoclastos (Arias & Marquez-Orozco, 2006).

Em outros ensaios, avaliou-se a influência do Paracetamol na taxa de Movimentação dentária em cobaias e observou-se que quando a dose de 200 mg/kg; v.o. foi utilizada, esta não causou nenhuma diferença significativa na MDI quando comparado ao grupo controle (Kehoe *et al.*, 1996). Em um estudo mais recente, utilizando a mesma dose de 200 mg/kg; v.o., por 14 dias, verificou-se que o Paracetamol não influenciou na MDI, não aumentando ou diminuindo a atividade osteoclástica em ratos *Wistar*, quando comparados a outros fármacos através de análise histológica. Corroborando com estes dados, outro estudo utilizando um método de avaliação por *scanner* eletrônico micrográfico detectou que a dose 200 mg/kg; v.o. de fato não alterou a taxa de movimentação dentária em ratos (Gonzales *et al.*, 2009). Utilizando ainda a mesma dose de 200 mg/kg; v.o., tida como dose capaz de promover analgesia adequada em modelos de dor em ratos, tem sido sugerido que o Paracetamol enquanto analgésico, possa não interferir na cinética da movimentação dentária induzida (Stabile *et al.*, 2009), o que seria desejável. Assim, de acordo com estes estudos a dose de 200 mg/kg; v.o. foi a escolhida para o grupo controle positivo nesse trabalho.

1.3.2 Dipirona Sódica

A Dipirona Sódica é um potente agente analgésico e antipirético amplamente utilizado na prática clínica há, aproximadamente, 80 anos. Em solução aquosa, a Dipirona é rapidamente hidrolizada em 3-metil-amino-antipirina (MAA), a qual, posteriormente, é metabolizada em 4-amino-antipirina (AA), 4-formil-amino-antipirina (FAA) ou 4-acetil-amino-antipirina (AAA). Dentre estes quatro metabólitos, a MAA tem sido classificada como o seu componente farmacologicamente ativo (Pierre *et al.*, 2007)

Dentre os mecanismos de ação locais propostos para os efeitos analgésicos da Dipirona inclui-se a ativação de canais de potássio (Alves & Duarte 2002; Sachs *et al.*, 2004). Por outro lado, a ativação desses canais também envolve receptores opióides, onde a morfina é o ativador protótipo, e os efeitos sobre outros operadores de canais de potássio são antagonizados por antagonistas opióides

(Campbell & Welch, 2001). No entanto, apesar desta correlação, estudos têm demonstrado que a Dipirona exerce um efeito farmacológico somente a nível periférico, independente de sistema opióide endógeno, conquanto sua ação não se mostrou afetada pela naltrexona, um antagonista opióide (Rezende *et al.*, 2008). Todavia, semelhante ao Paracetamol, estudos vêm mostrando que o principal mecanismo de ação analgésico e/ou antipirético da Dipirona Sódica também se baseia na inibição da COX-3 (Chandrasekharan *et al.*, 2002).

Alguns estudos sugerem que o efeito analgésico periférico de longa duração da Dipirona possa ser devido à ativação da via arginina-NO-GMPc-canais de K⁺ sensíveis ao ATP, provavelmente, induzindo dessensibilização dos terminais nociceptivos no neurônio sensorial primário. Este mecanismo pode ser responsável pela manutenção deste quadro antinociceptivo de longa duração (Duarte *et al.*, 1992; Lorenzetti, *et al.*, 1996).

A ação periférica antinociceptiva da Dipirona sódica tem sido associada à ativação de sistema opióide endógeno, observada pelo “*tail-flick test*” em camundongos (Dogrul *et al.*, 2007). Esta também é capaz de produzir um efeito antinociceptivo de forma dose-dependente quando avaliada sob teste da placa quente (Milano *et al.*, 2008). Utilizando o modelo de inflamação crônica induzido por um agente imunogênico Adjuvante de Freund (CFA, de *Complete Freund's Adjuvant*) em ratos, provou ser mais potente analgésico quando comparado com agentes anti-inflamatórios (Tatsuo *et al.*, 1994).

Foi demonstrado que doses entre 56,2 e 562,3 mg/kg; s.c. de Dipirona Sódica possui efeito antinociceptivo e que a associação com a morfina potencializa sua analgesia (López-Muñoz *et al.*, 1993; López-Muñoz, 1994). Mais recentemente, demonstrou-se que a dose de 177,8 mg/kg; s.c. de Dipirona Sódica promoveu potente efeito antinociceptivo em diferentes níveis de nocicepção utilizando o modelo dor induzida por incapacidade funcional em ratos (PIFIR, de *Pain-induced functional impairment model in the rat*), por meio de injeção intra-articular de ácido úrico, através do ligamento patelar dos animais (López-Muñoz, 2008).

Através do teste de formalina em ratos observou-se uma tendência para antinocicepção já com uma dose de 100 mg/kg; s.c., e bloqueio de fato, da resposta dolorosa, com a dose de 200 mg/kg; s.c. (Abbott & Helleman, 2000). Têm sido mostrado através do teste “*tail flick*” que doses entre 200 e 400 mg/kg; i.v. de Dipirona inibiram, de forma dose-dependente, os reflexos durante os teste realizados

em ratos (Tortorici & Vanegas, 1994). Outros estudos demonstraram efeito antinociceptivo da Dipirona em ratos com dose de 600 mg/kg; i.v., duas vezes ao dia, potencializando seus efeitos quando em associação com a morfina (Hernández-Delgadillo & Cruz, 2003, 2004, 2006). Ainda, utilizando a dose de 467 mg/kg; i.p. de Dipirona no teste da “Placa Quente” ou no teste da formalina, observou-se efeito antinociceptivo nos camundongos (Milano *et al.*, 2008)

Estudos recentes demonstraram efeitos similares de analgesia em termos de intensidade e duração utilizando Paracetamol ou Dipirona, apesar dos mecanismos de ações serem relativamente diferentes (Rezende *et al.*, 2008). Comparando o efeito analgésico destes fármacos através de teste de limiar de nocicepção em ratos, utilizando doses de 60, 180 e 360 mg/kg; s.c., foi reportado que a maior dose tanto do Paracetamol como também da Dipirona foi significativamente mais efetiva em promover efeitos analgésicos que as demais doses (Rezende *et al.*, 2008). Ainda, o Paracetamol e a Dipirona sódica têm sido reportados como capazes de reduzir a dor pós-operatória em humanos com o mínimo de efeitos colaterais (Grundmann *et al.*, 2006; Kampe *et al.*, 2006).

Contudo, inexistem estudos utilizando a Dipirona sódica especificamente na MDI, abordagem tal que parece ser interessante de ser realizada, visto que tal agente farmacológico é amplamente difundido mundialmente e que possui efeito analgésico comprovado em diversos ensaios.

1.4. JUSTIFICATIVA

Considerando que a movimentação dentária induzida causa um processo inflamatório onde mediadores, como citocinas e prostaglandinas, podem tomar parte do processo de remodelação óssea alveolar, aliado ao conhecimento de que o Paracetamol e a Dipirona sódica são fármacos que têm se destacado por seus efeitos analgésicos sem interferir significativamente em mediadores inflamatórios periféricos. Com base no fato de que o Paracetamol parece não interferir no processo de remodelação óssea durante a MDI, parece-nos razoável avaliar a atividade da Dipirona Sódica no processo de remodelação óssea que ocorre durante a movimentação dentária induzida em ratos, considerando escassos os estudos envolvendo este fármaco durante este processo.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a atividade da Dipirona sódica na remodelação óssea durante movimentação dentária induzida em ratos.

Objetivos Específicos

- Avaliar microscopicamente a resposta inflamatória e o osso alveolar em ratos submetidos à MDI e recebendo Dipirona sódica, Paracetamol ou Salina através de análise histológica semi-quantitativa, histomorfométrica e marcação imunohistoquímica para TRAP.
- Avaliar as alterações bioquímicas através das dosagens de mieloperoxidase gengival e de dosagens de Fosfatase Alcalina Óssea (FAO).
- Avaliar a repercussão sistêmica de Dipirona sódica, Paracetamol e Salina através de:
 - Análise do leucograma de ratos submetidos à MDI e recebendo Dipirona sódica, Paracetamol e Salina;
 - Avaliação das funções hepáticas em ratos submetidos à MDI e recebendo Dipirona sódica, Paracetamol e Salina através de dosagens das TGO e TGP para as funções hepáticas,
 - Avaliação da variação da massa corpórea.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Seleção de animais

Foram utilizados ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* machos, com massa corpórea entre 180 e 220 gramas. Esses animais, procedentes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC, foram transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (FaMed, UFC-Fortaleza), e mantidos em gaiolas apropriadas, em número de 5 a 6 animais em cada uma delas. Os ratos receberam ração comercial balanceada própria e água à vontade, e permaneceram nas mesmas condições ambientais durante os experimentos. Todos os esforços foram realizados no sentido de diminuir o número de animais e seu sofrimento, com base nas orientações para pesquisas com animais, e todos os procedimentos aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) dessa instituição (protocolo nº 18/2010).

3.2. Aparelhos, Instrumentos Laboratoriais, Materiais de Consumo

Durante o decorrer dos experimentos foram utilizados diversos aparelhos e instrumentos, os quais são citados a seguir:

- Algodão e gaze (CREMER[®]);
- Alicata ortodôntico de corte de amarrilho (Quinelato[®] - ref. QO.151.00; Rio Claro - SP);
- Balança pra pesagem de animais (Bioprescisa[®] - mod. BS3000A);
- Base emborrachada para permanência do animal;
- Béqueres (PIREX);
- Câmara de Neubauer (0,100/0,0025 mm²);
- Câmara de captura de imagens do microscópio (PHENIX[®] - MC-130U)
- Centrífuga (Centribio[®] - mod. 2400);
- Contador diferencial de células de 8 teclas (Digitimer[®]);
- Fio de amarrilho de aço inox de 0,008 polegadas (Morelli[®] - ref. 55.01.208; Sorocaba-SP);
- Geladeira e freezer (-80 °C e -20 °C)
- Instrumentais cirúrgicos (tesoura, pinça, porta-agulhas)
- Lâminas e lamínulas para microscopia;

- Luminária;
- Luvas descartáveis;
- Micropipetas automáticas (Gilson);
- Microscópio óptico binocular (Opton[®] - mod.XSZ-107T);
- Micrótomos
- Mola fechada de níquel-titânio (Ormico[®]- ref. 222-5610; Orange -EUA);
- Ponteiras
- Seringas de 1, 5, e 10 ml e agulhas 29 G, 25 G;
- Tubos de ensaio de vidro (PIREX);
- Tubos Eppendorf – 1,5 ml (GIBCO);
- Tubos plásticos de 15 ml (FALCON);
- Motor elétrico (Dentec[®])
- Resina fotopolimerizável (Natural Look - DFL[®]; São Cristovão-RJ)
- Tensiômetro (Morelli[®] - ref.75.02.009, Sorocaba-SP)
- Fotopolimerizador Led (Gnatus[®] - Optilight LD MAX – Ribeirão Preto – SP)

3.3. Drogas, soluções e corantes utilizados

- Água destilada.
- Álcool Etílico Absoluto (Dinâmica);
- Corante rápido de hematoxilina e eosina (NewProv[®]- Pinhais-PR);
- Dipirona Sódica (Novalgina[®], gotas; Sanofi-Aventis; Suzano-SP);
- EDTA p.a. (Dinâmica);
- Eosina;
- Formaldeído 37,5% (Dinâmica);
- Ketamina (Cetamin - Syntec[®], Hortolândia – SP, Brasil);
- Líquido de Turk (diluidor para contagem total de células)

Ácido acético glacial P.A.....	20,0 ml
Violeta genciana.....	2,0 ml
Água destilada (qsp).....	1.000 ml
- Paracetamol (Tylenol[®], gotas; Jansen-Cilag; São José dos Campos-SP);
- Soro fisiológico 0,9% (NaCl 0,15 M) Frasco com 500 ml
- Xilasina (Xilazin - Syntec[®], Hortolândia – SP, Brasil).

3.2. Protocolo Experimental

3.2.1 Modelo de Movimentação Dentária Induzida Experimental

3.2.1.1 Preparo do Aparelho Ortodôntico

Para este estudo foi utilizado o modelo de Movimentação Dentária Induzida (MDI) por dispositivo ortodôntico adaptado a partir de vários autores (Heller & Nanda, 1979; Ren *et al.*, 2004), o qual consiste na utilização de uma mola fechada de níquel-titânio (Ormco[®] - ref. 222-5610; CA - EUA), e fio de amarelo de aço inox de 0,008 polegadas (Morelli[®] - ref. 55.01.208; Sorocaba-SP- Brasil) para fixação em torno do primeiro molar superior esquerdo e dos incisivos superiores.

3.2.1.2 Anestesia, Instalação e Ativação do Aparelho Ortodôntico

Os animais foram anestesiados com a mistura em iguais partes do anestésico cloridrato de quetamina, 100 mg/ml (Cetamin - Syntec[®]) e o relaxante muscular cloridrato de xilazina, 20 mg/ml (Xilazin - Syntec[®]) na dosagem de 1 ml/kg, aplicado de forma intramuscular, com seringa de 1 ml e agulha de 12,7 mm estéril acoplada. Os animais anestesiados foram posicionados em mesa operatória própria para contenção e abertura da boca do animal, e as molas foram fixadas ao primeiro molar superior esquerdo e aos incisivos superiores, por meio de fio de amarelo.

Para melhor adaptação desses fios nos incisivos foi criada uma canaleta (pequeno sulco) na região cervical vestibular dos dentes através de disco de corte em um contra-ângulo odontológico adaptado em motor elétrico (Dentec[®]) sob irrigação com soro fisiológico, e usada resina fotopolimerizável (Natural Look - DFL[®]; São Cristovão-RJ-Brasil) para uma retenção mecânica adicional.

A seguir, foi feita ativação da mola de 1 a 2 milímetros, o que corresponde a uma força de 50 g mensurada por tensiômetro (Morelli[®] - ref.75.02.009, Sorocaba-SP-Brasil). Após a ativação inicial do aparelho, este não recebeu mais nenhuma ativação adicional durante todo o experimento. Os animais foram, então, monitorados diariamente quanto à presença do dispositivo.

A MDI ocorreu no primeiro molar esquerdo, no sentido mesial, e nos incisivos superiores, no sentido palatino. Os molares superiores do lado direito foram

utilizados como controle para a padronização das observações dos fenômenos biológicos da movimentação dentária induzida (Fig. 1).

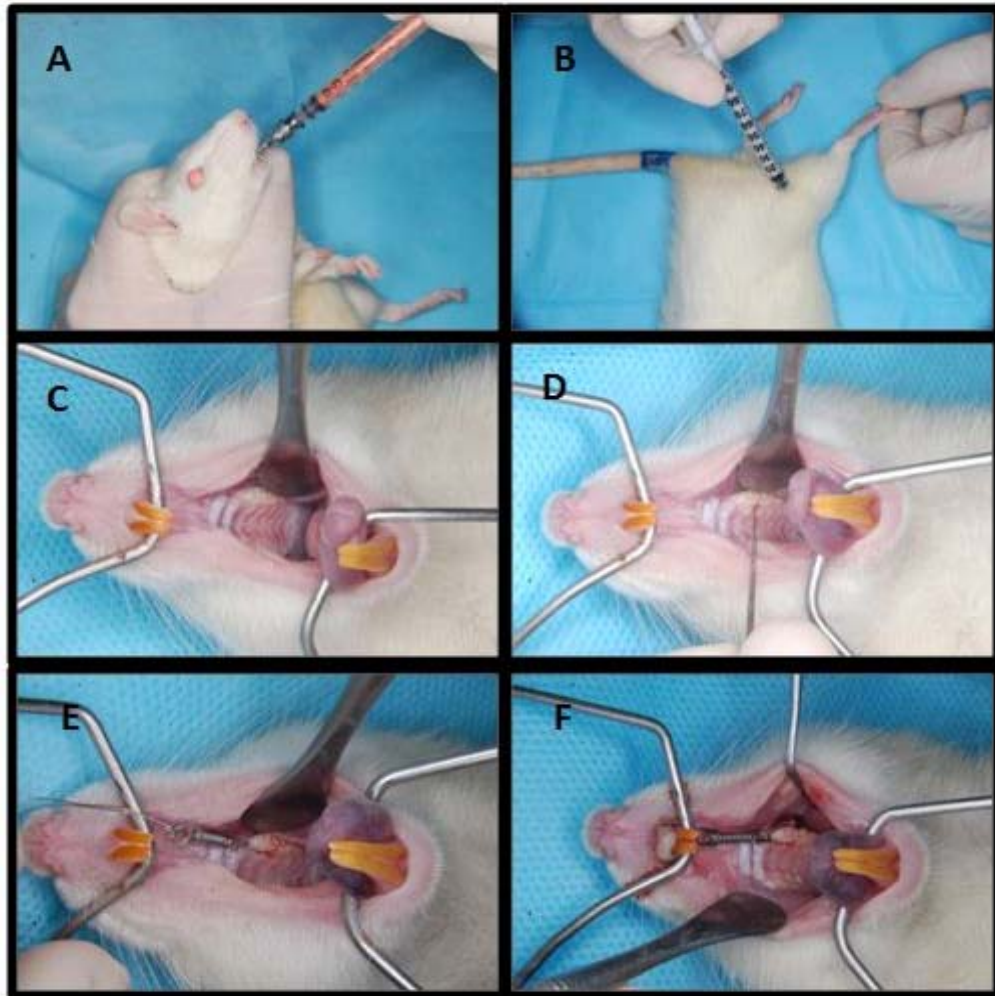


Figura 1: Fotografias da sequência de passos para a realização do modelo experimental de Movimentação Dentária Induzida (MDI) no primeiro molar superior esquerdo em rato. A. Administração da medicação por gavagem; B. Anestesia via i.m.; C. Visualização do campo operatório; D. Inserção de agulha como guia para a passagem do fio entre o primeiro e o segundo molar superior esquerdo; E. Instalação e ativação da mola de níquel-titânio; F. Amarração nos incisivos e inserção de resina fotopolimerizável sobre a amarração (imagens de arquivo pessoal).

3.2.2. Grupos Experimentais

Preliminarmente, grupos de 8 animais submetidos à MDI foram sacrificados após 6 horas e nos dias 1, 4, 7, 11 e 14 após a ativação do dispositivo ortodôntico. Foram avaliadas as áreas de reabsorção e uma vez definido qual o dia ideal (4º dia) onde se observou o pico de reabsorção óssea alveolar, seguiram, portanto, as abordagens farmacológicas durante o referido período.

A. Grupos Salina

Esse grupo foi constituído por 10 ratos submetidos à MDI. Os animais receberam solução salina a 0,9% (2 ml/kg-v.o.), 30 minutos antes da instalação do aparelho e, após este, diariamente por 4 dias, sendo então, sacrificados.

B. Grupos tratado com Paracetamol

O grupo foi constituído por 8 animais, os quais receberam Paracetamol (Medicamento de Referência Tylenol[®], gotas; Jansen-Cilag; São José dos Campos-SP-Brasil), na dose de 200 mg/kg; v.o., (Stabile *et al.*, 2009) respectivamente, administradas 30 minutos antes da instalação do aparelho e após este, diariamente, 1 vez ao dia, por 4 dias, sendo então, sacrificados (Gonzales *et al.*, 2009).

C. Grupo tratado com Dipirona Sódica

O grupo foi constituído por três subgrupos de 8 animais cada, os quais receberam Dipirona sódica (Medicamento de Referência Novalgina[®], gotas; Sanofi-Aventis; Suzano-SP-Brasil), nas doses de 25, 75 e 225 mg/kg; v.o., respectivamente, administradas 30 minutos antes da instalação do aparelho e após este, diariamente, 1 vez ao dia, por 4 dias, sendo então, sacrificados (López-Munõz *et al.*, 1994; Abbott & Hellemans, 2000; Milano *et al.*, 2008).

3.3. Parâmetros avaliados na MDI Experimental

A movimentação dentária induzida foi avaliada através de análises histológicas das hemiarçadas dos animais e de avaliações das repercussões bioquímicas e sistêmicas dos fármacos utilizados (Fig. 2).

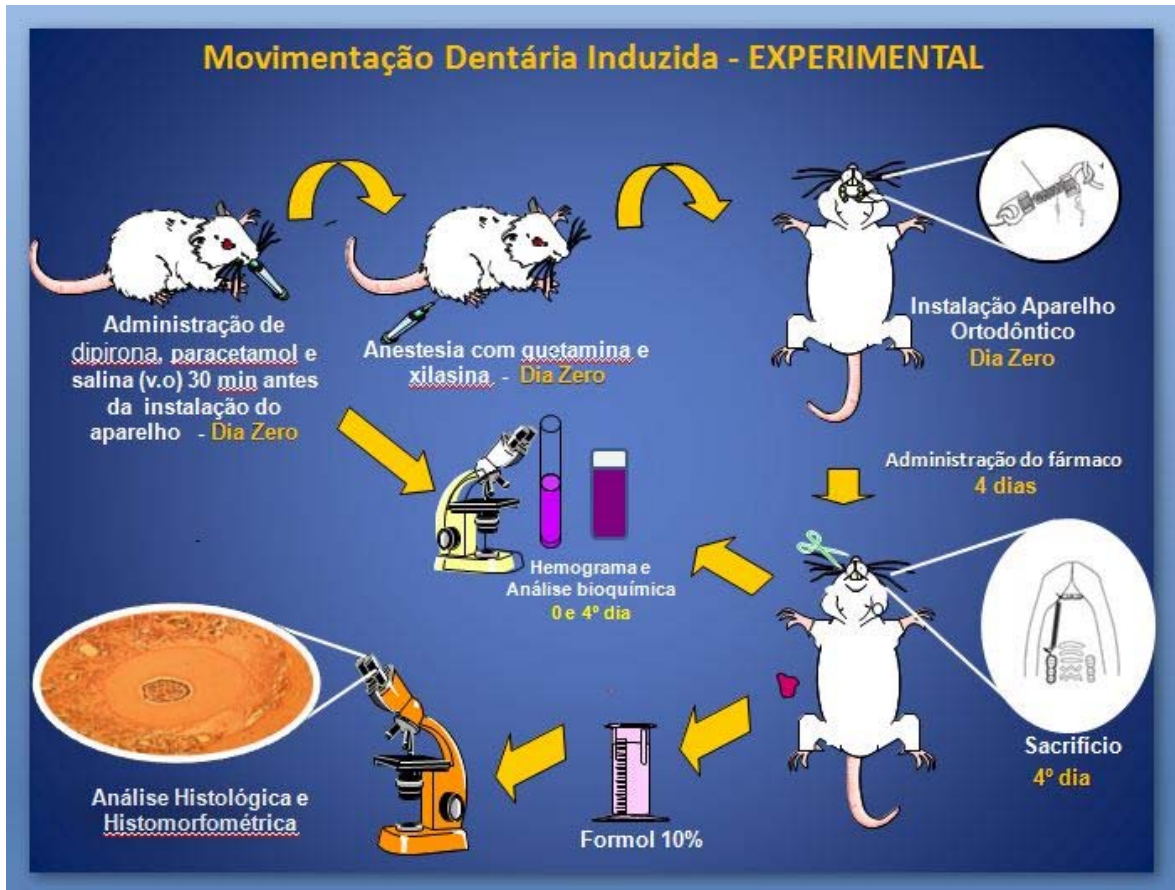


Figura 2: Representação esquemática do modelo de movimentação dentária induzida em ratos. Para a MDI os ratos receberam: Salina (SAL=2 ml/kg), Paracetamol (PAR 200 mg/kg) ou Dipirona sódica dividido em 3 subgrupos (DIP 25; 75 ou 225 mg/kg), administrados por via oral, diariamente 30 min antes da instalação do dispositivo ortodôntico entre o 1º molar superior esquerdo e os incisivos durante 4 dias, quando, então, foram sacrificados e os seguintes parâmetros avaliados: 1) Análises microscópicas do periodonto através de: a) estudos histológico semi-quantitativo, morfométrico e marcação imunohistoquímica para TRAP; b) análises da atividade da mieloperoxidase (MPO) gengival; 2) Dosagem sérica de Fosfatase Alcalina Óssea (FAO); e 3) Avaliação sistêmica através de: a) leucograma; b) dosagens séricas de TGO e TGP e c) variação de massa corpórea

3.3.1. Análise histológica da estrutura do periodonto

A estrutura óssea alveolar observada na MDI foi estudada através de análises histológica semi-quantitativa e histomorfométrica para as áreas hialínicas, bem como marcação imunohistoquímica para TRAP. As hemiarcadas não submetidas à movimentação dentária, ou seja, as contralaterais, foram utilizadas como controle do próprio animal.

A. Análise histológica

As análises histopatológicas foram realizadas em cortes seriados da hemiarcada desmineralizada. Para tanto, 4 dias após a inserção do dispositivo ortodôntico, os animais foram sacrificados e suas hemiarcadas removidas e fixadas em formol a 10% por 24 horas. A seguir, foram desmineralizadas por EDTA a 10%, durante, aproximadamente, 30 dias. A seguir, as hemiarcadas foram lavadas em água corrente por 24 horas e, após a inclusão em parafina, foram feitos os cortes transversais seriados de 4 μm em micrótomo apropriado. Os cortes transversais foram feitos na porção cervical das raízes do primeiro molar superior esquerdo. As lâminas obtidas foram coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina. Para a análise microscópica da hemiarcada, foi considerada a região correspondente a face mesial da raiz mesial do primeiro molar superior direito (Fig. 3)

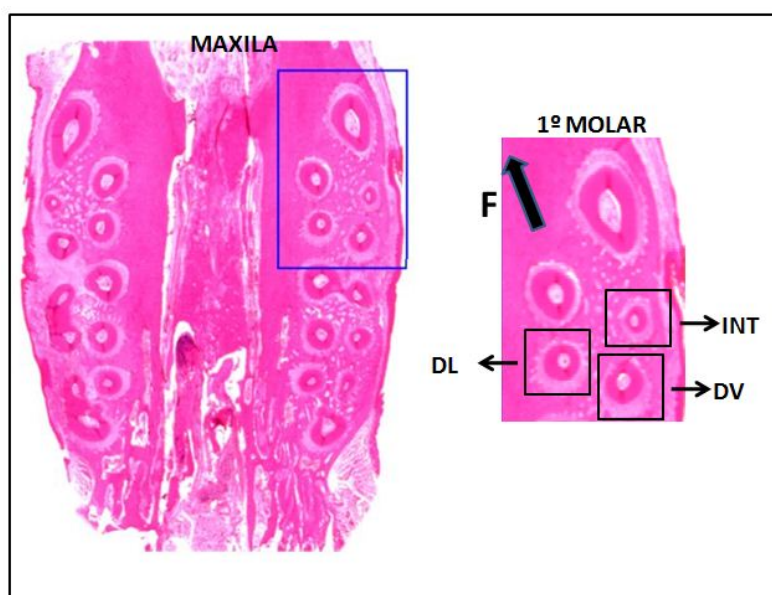


Figura 3: Fotomicrografia da área desafiada para análise histológica. Corte transversal da maxila do rato no terço cervical do primeiro molar esquerdo. No destaque estão as raízes utilizadas para análise histológica: distovestibular (DV), distolingual (DL) e intermediária (INT). Imagem obtida e modificada a partir de lâmina escaneada (Fracalossi *et al.*, 2009).

A.1. Análise Histológica Semi-quantitativa

Foram avaliadas histologicamente, as raízes Intermediária, Disto-vestibular e Disto-lingual, considerando os aspectos inflamatórios como presença e intensidade de infiltrado celular, presença de células clásticas, além do estado de preservação do processo alveolar e cemento, diminuição do espaço do ligamento periodontal no lado de compressão, atribuindo-se escores que variaram de 0 a 4, de acordo com a intensidade dos achados (Quadro 1), baseado em Lima et al., 2000 e 2004.

A.2 Análise histomorfométrica

Realizou-se análise histomorfométrica nas raízes distovestibular, distolingual e intermediária do primeiro molar superior esquerdo do rato. Esta análise se constituiu na quantificação do percentual de áreas hialinas no ligamento periodontal nos lados de pressão de cada raiz, nos diferentes grupos. Para a quantificação utilizou-se um sistema para análise de imagem digitalizada, composto por um microscópio óptico binocular Opton XSZ-107T, com objetiva de 4X e câmera MC-130U conectados a um computador. Após a aquisição das imagens, estas foram lançadas no *software* Image J[®] para quantificação das áreas hialínicas

Com o emprego do programa Image J[®] contornou-se o maior perímetro radicular, desenhando uma linha coincidente com o limite mais externo do cemento. Em seguida, desenhava-se uma segunda linha contornando o trabeculado ósseo na periferia do ligamento periodontal. Este procedimento permitiu calcular a área total do ligamento periodontal. Da mesma maneira, contornou-se externamente cada área hialina no ligamento periodontal. A partir destas áreas, calculou-se o percentual (%) de área hialina no ligamento periodontal de cada raiz. (Miyoshi *et al.*, 2001; Tomizuka *et al.*, 2007; Von Böhl *et al.*, 2009) (Fig. 4).

Quadro 1: Aspectos teciduais e celulares para avaliação microscópica no lado de compressão do ligamento periodontal.

Score 0	<p>Ausência de áreas hialínicas Ausência de células clásticas Espaço do ligamento periodontal uniforme Vasos sanguíneos normais Ausência reabsorção óssea frontal Ausência de reabsorção dentária (superfície cementária uniforme)</p>
Score 1	<p>Ausência de áreas hialinas Presença de poucas células clásticas (osteoclastos) Espaço do ligamento periodontal uniforme Vasos sanguíneos normais e alguns congestos Ausência reabsorção óssea frontal Ausência de reabsorção dentária (superfície cementária uniforme)</p>
Score 2	<p>Pequenas áreas em processo de hialinização Presença de clastos na superfície óssea (osteoclastos) Ligamento periodontal com espessura diminuída Vasos sanguíneos congestos e discreta hemorragia Tecido ósseo frontal irregular com poucas cavidades reabsortivas Ausência de reabsorção dentária (superfície cementária uniforme)</p>
Score 3	<p>Presença de poucas áreas hialinas Poucos osteoclastos justapostos à superfície Ligamento periodontal com espessura diminuída Vasos sanguíneos congestos e discreta hemorragia Tecido ósseo frontal irregular com cavidades reabsortivas Ausência de reabsorção dentária (superfície cementária uniforme)</p>
Score 4	<p>Presença de grandes áreas hialinas Osteoclastos justapostos à superfície ou nas lacunas de reabsorção Ligamento periodontal com espessura diminuída Vasos sanguíneos congestos Tecido ósseo frontal irregular com muitas cavidades reabsortivas Ausência de reabsorção dentária (superfície cementária uniforme)</p>

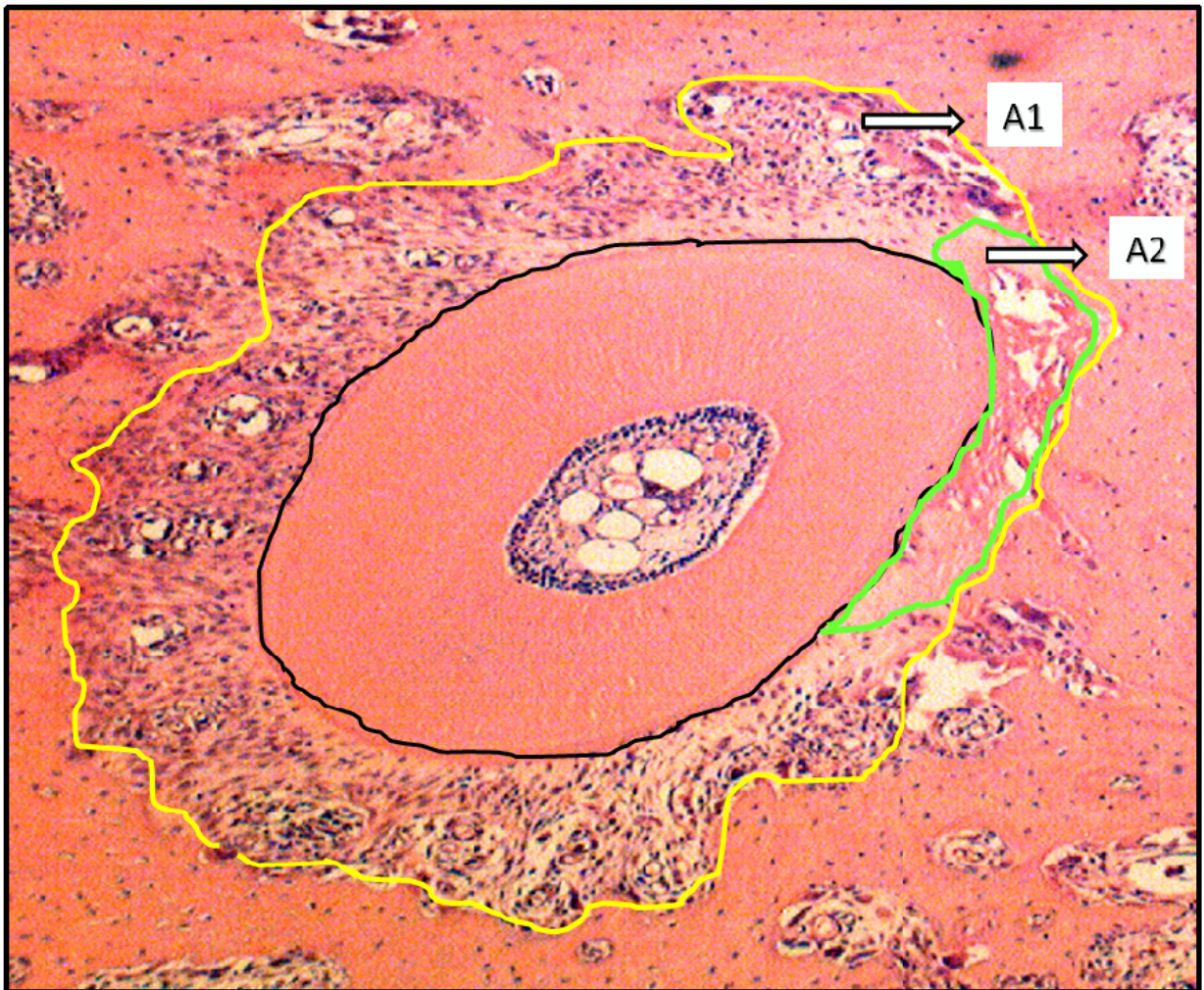


Figura 4: Quantificação de áreas hialínicas. Determina-se a área total de ligamento periodontal (A1), e a área hialínica de ligamento periodontal (A2). Em seguida quantifica-se proporcionalmente (A2) de (A1). A quantidade de área hialínica foi expressa em percentual. (Arquivo pessoal)

A.3 Marcação imunohistoquímica de TRAP

Os cortes histológicos horizontais da maxila foram submetidos ao método da imunoperoxidase indireta empregando anticorpo policlonal para identificar a proteína tartrato-resistente à fosfatase ácida (TRAP).

Para isto, inicialmente os cortes histológicos foram coletados em lâminas silanizadas, desparafanizados em xilol e reidratados em série decrescente de alcoóis (100-70°). Estes foram lavados (3x5 minutos) em tampão fosfato de sódio (PB) 0.1M, pH 7,4, sob agitação lenta (25 rpm) e submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena empregando peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por 30 minutos e lavados (5x5 minutos) com PBS.

Dando continuidade, os cortes histológicos foram incubados com solução contendo o anticorpo primário policlonal obtido em cabra anti-TRAP K17 de humano (sc30833, concentração de 1:100, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), diluído em PBS acrescido de soro normal de burro (017-000-001, *Jackson Immunoresearch laboratories*, PA, USA), durante 24 horas a temperatura ambiente, sob agitação. Os cortes histológicos foram novamente lavados em PBS (5x5 minutos) e submetidos à segunda incubação com anticorpo secundário biotilado anti-cabra feito em burro (705-066-147, 1:200, *Jackson Immunoresearch laboratories*, PA, USA), diluído em PBS acrescido de soro normal de burro durante 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. Os cortes histológicos foram novamente submetidos a lavagens em PBS (5x5 minutos) e incubados em estreptavidina conjugada com peroxidase (1:200, Kit ABC, PK6100, *Vector Laboratories*, CA, USA) diluído em solução de PB a temperatura ambiente, durante 1 hora. A revelação da reação de imunoperoxidase foi realizada em solução de PBS acrescido com diamobenzidina (0,005%), seguido de inativação através de inúmeras lavagens em PBS.

Estes cortes histológicos foram contra-corados com hematoxilina de Harris, desidratados, diafanizados em xilol e montados com meio de montagem hidrofóbico (Erv-mount, Erviegas, SP, Brasil).

Todas as reações de imunoperoxidase foram acompanhadas por um controle negativo, através da omissão do anticorpo primário ou secundário, seguido dos demais procedimentos citados anteriormente.

B. Análises Bioquímicas

Foi realizada a análise da atividade de mieloperoxidase a partir de tecido gengival subjacente à área desafiada recolhida por ocasião do sacrifício dos animais. Foi também realizada a dosagem sérica de Fosfatase Alcalina Óssea (FAO) antes (baseline) e ao final do experimento para avaliação do metabolismo ósseo.

B.1 Análise da atividade da mieloperoxidase gengival

No dia do sacrifício, os animais foram sacrificados, suas maxilas removidas e os tecidos gengivais subjacente à área desafiada removidos e congelados para análise da atividade da mieloperoxidase, enzima encontrada abundantemente em neutrófilos em atividade.

A atividade de mieloperoxidase, um marcador de neutrófilos em tecidos inflamados foi avaliada no tecido gengival da área desafiada, usando uma versão modificada de Bradley *et al.* (1982) (Lima *et al.*, 2005). Os animais tiveram removidas amostras do tecido gengival no dia do sacrifício para análise da atividade de MPO. Os espécimes foram armazenados à temperatura de 70 °C até a realização do ensaio. O tecido gengival foi pesado e triturado usando uma politron Ultraturrax em solução tampão resfriada (0,1 M NaCl, 20 mM Na₃PO₄, 15 mM NaEDTA), e então esta massa foi centrifugada a 4 °C por 15 minutos (3.000 *g*). O homogeneizado será então submetido à lise hipotônica [900 uL de 0,2% (w/v) NaCl seguido, 30 segundos depois, por adição de solução de igual volume contendo 1,6%/(w/v) NaCl e 5% (w/v) glicose]. O homogeneizado final foi novamente suspenso em solução tampão [50 mM Na₃PO₄, 0,5% (w/v) brometo sólido de hexadeciltrimetilamônia (H-TAB)], homogeneizado, congelado e descongelado duas vezes e centrifugado a 4 °C por 7 min (4.000 *g*). O sobrenadante foi armazenado a 0 °C para o ensaio de MPO usando tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM), e a concentração de MPO foi determinada através da mensuração da mudança e absorbância à 450 nm. Valores foram expressos como quantidade da atividade de MPO por grama de tecido comparado a curva padrão de neutrófilos, construída usando neutrófilos da cavidade peritoneal do rato. A fim de obter esta curva, a migração neutrofílica foi induzida no peritônio dos animais através da injeção de carragenina (300 µg por animal). A curva padrão, relacionando número de

neutrófilos (>90% pureza) e absorvância, foi obtida usando o processamento de neutrófilos purificados, como descrito anteriormente, e ensaio para atividade de MPO. Resultados foram expressos como unidade de MPO/mg de tecido. A unidade da atividade de MPO foi definida como 1 convertendo 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de peróxido de hidrogênio em água a 22 °C.

B.2 Dosagem de Fosfatase Alcalina Óssea

No 4º dia, por ocasião do sacrifício dos animais, foram coletadas amostras de sangue a partir do plexo orbital, dos grupos experimentais. Estas amostras foram centrifugadas 4.000 g por 10 minutos e o sobrenadante coletado e congelado para posterior dosagem sérica. A determinação dos níveis séricos de FAO segue o protocolo de inativação térmica (Moss & Whitby, 1975). Inicialmente será feita a dosagem de fosfatase alcalina total (FAT). Em seguida, as amostras serão aquecidas a 56°C durante 10 minutos e uma nova dosagem será realizada. Os níveis séricos de FAO serão obtidos através da subtração dos níveis de FAT pelos níveis de FA aquecida. A metodologia a ser seguida será conforme orientação do laboratório fabricante (LABTEST®).

C. Análise dos parâmetros sistêmicos

C.1 Estudo hematológico

Sob anestesia com cetamina e xilazina, os animais tiveram a ponta da cauda seccionada com uma tesoura. A primeira gota de sangue foi desprezada e a seguinte, colhida para a confecção do esfregaço corado pelo método HE para as contagens diferenciais. Adicionalmente, 20 μl de sangue foram diluídos em 380 μl de Líquido de Turk, para a realização da contagem do número total de leucócitos, utilizando câmara de Neubauer. Logo após, os animais tiveram suas caudas cauterizadas, para evitar infecções. Os hemogramas foram realizados imediatamente antes da cirurgia e no dia do sacrifício.

C.2 Dosagens séricas de TGO e TGP

No 4º dia, por ocasião do sacrifício dos animais, foram coletadas amostras de sangue e a função hepática dos animais foi avaliada através da determinação da atividade sérica das enzimas transaminases (TGO e TGP). A quantificação foi feita utilizando-se “Kits” específicos para cada tipo de dosagem. A metodologia seguiu orientação do laboratório fabricante (LABTEST®).

C.3 Avaliação da variação de massa corpórea

Todos os animais tiveram suas massas corporais medidas antes da cirurgia e, após esta, diariamente, até o dia do sacrifício. Os valores encontrados foram expressos como a variação de massa corpórea (g) em relação à massa inicial.

3.4. Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará, sob o protocolo de número 18/10. Os pesquisadores envolvidos realizaram todos os esforços para reduzir ao mínimo o número de animais utilizados, bem como o sofrimento dos mesmos, de acordo com os princípios éticos para se trabalhar com animais de laboratório.

3.5. Análise estatística

Para os dados paramétricos, os resultados foram expressos como Média±EPM, acompanhada do número de observações. Nas comparações entre os grupos foi utilizada Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni.

Para os dados não paramétricos, os resultados obtidos foram expressos como Mediana acompanhada de menor-maior valores, e os testes estatísticos aplicados foram Kruskal-Wallis e Dunn.

Em todas as situações, foi adotado o nível de significância $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Movimentação Dentária Induzida em Ratos

Foi utilizado o modelo de Movimentação Dentária Induzida (MDI), através da inserção de um dispositivo ortodôntico, adaptado a partir de vários autores (Heller & Nanda, 1979; Ren *et al.*, 2004; Fracalossi *et al.*, 2009). Os parâmetros locais do tecido periodontal e osso alveolar foram avaliados através de: análises histológica semi-quantitativa, histomorfométrica e imunohistoquímica para detecção de TRAP. Parâmetros bioquímicos também foram avaliados, tais como dosagens de atividade de MPO e nível sérico de FAO. Por último, foram avaliados parâmetros sistêmicos dos animais através de análise do leucograma, enzimas transaminases hepáticas e variação de massa corpórea.

4.1.1. Parâmetros locais do Ligamento Periodontal e Osso Alveolar

A. Efeitos da MDI sobre o Ligamento Periodontal (LP) e Osso Alveolar nos grupos experimentais

O modelo de MDI foi utilizado para o estudo dos efeitos da Dipirona Sódica. Inicialmente, grupos de 8 animais foram sacrificados às 6 horas e nos dias 1, 4, 7, 11 e 14 após a ativação do dispositivo ortodôntico. Todas as lâminas obtidas a partir da hemimaxila dos animais foram analisadas, baseada no quadro de escores (Quadro 1) para então definir o dia ideal como 4º, onde se observou considerada reabsorção óssea frontal na área de compressão do LP. A figura 5 mostra que a MDI nos animais que receberam solução Salina causou alterações teciduais significante no LP e osso alveolar, quando comparada a raízes do molar contralateral não submetido à MDI, considerado como controle. As modificações referentes ao escore 1 mostraram-se significantes a partir do 1º dia após instalação do dispositivo e perduraram até o 11º. Observou-se a maior quantidade de áreas hialínicas e reabsorção frontal no lado de compressão do LP no 4º dia em comparação aos demais. A partir do 7º dia observou-se redução significante de áreas hialínicas quando comparado ao 4º dia, seguido de eventos de regularização da superfície óssea até o 11º dia ($p < 0,05$). No 14º dia os tecidos adjacentes as raízes dos molares submetidos à MDI apresentavam-se com aspecto semelhante ao de dentes não movimentados, não havendo diferença significante ($p > 0,05$) em relação ao grupo controle (Figura 5).

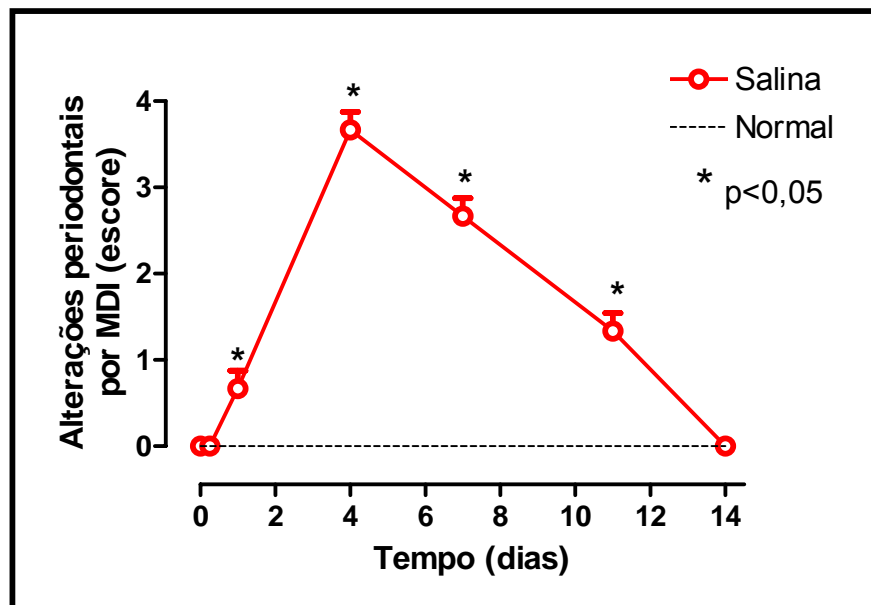


Figura 5: Efeitos histológicos da MDI sobre o Ligamento Periodontal e Osso Alveolar nos controles: Os animais receberam 0,5 ml de Salina a 0,9% (v.o.) 30 minutos antes da instalação do dispositivo. Os escores representam as alterações teciduais observadas nas raízes distolingual, distovestibular e intermediária do primeiro molar superior esquerdo de um rato submetido a MDI. Os resultados foram expressos como Mediana±valores extremos de seis animais. * $p < 0,05$ representa diferenças estatísticas dos animais que tiveram o molar movimentado em relação a hemiarcada contralateral (Normal) (Kruskal-Wallis; Dunn).

B. Efeitos histológicos da MDI sobre o Ligamento Periodontal e Osso Alveolar nos Controles

A análise histológica, das hemiarcadas dos ratos submetidos a MDI, realizada ao longo de 14 dias, e que receberam salina, mostrou alterações significantes ($p < 0,05$) em relação aos animais normais não submetidos a MDI (Tabela 1). Nas seis primeiras horas após indução da MDI não se observou presença de infiltrado inflamatório, áreas hialinas ou células clásticas, o espaço do ligamento periodontal estava uniforme, os vasos sanguíneos normais, não haviam sinais de reabsorção óssea frontal, bem como ausência de reabsorção dentária [Md=0 (0-0)], sendo este aspecto histológico semelhante ao observado nas hemiarcadas normais. Na 24^a hora após a cirurgia, foi possível verificar discreto infiltrado inflamatório, ausência de áreas hialinas, presença de poucas células clásticas (osteoclastos), espaço do ligamento periodontal uniforme, vasos sanguíneos normais e alguns congestos, ausência de reabsorção óssea frontal e superfície cementária uniforme [Md=1 (0-1)].

Nos molares, quatro dias após a movimentação ortodôntica, os fenômenos observados mostraram-se mais evidentes em relação dos do 1^o dia, principalmente no que se refere às áreas hialínicas, podendo-se observar: osteoclastos justapostos à superfície ou nas lacunas de reabsorção, presença de ligamento periodontal com espessura diminuída, vasos sanguíneos congestos e discreta hemorragia, tecido ósseo frontal irregular com cavidades reabsortivas e ausência de reabsorção dentária, inclusive presença de superfície cementária uniforme [Md=4 (3-4)].

A partir do 7^o dia, as áreas hialinas mostraram-se reduzidas. Adicionalmente, observou-se acentuado estiramento das fibras periodontais no lado de tensão em todas as raízes analisadas. Foi possível visualizar também, no lado de tensão, poucos osteoclastos justapostos à superfície, ligamento periodontal com espessura diminuída, vasos sanguíneos normais, tecido ósseo frontal irregular com pouca cavidade reabsortiva e focos de reabsorção radicular em duas das raízes observadas [Md=3 (2-3)].

Aos 11 dias observou-se alterações teciduais tais como: ausência de áreas hialínicas ou pequenos focos de hialinização, ausência de infiltrado inflamatório, diminuição do número de osteoclastos em relação ao grupo normal

($p < 0,05$). As superfícies radiculares apresentaram-se com evidentes áreas de reabsorção e o ligamento periodontal com espessura quase uniforme comparando os lados de compressão e tensão, a superfície óssea adjacente ao lado de pressão apresentou ainda discretas irregularidades (Md=1 [1-2]). No 14º dia após a instalação do dispositivo ortodôntico as raízes dos molares movimentados apresentaram características de normalidade, com ausência de: osteoclastos, vasos congestos ou áreas hialínicas. A espessura do ligamento periodontal apresentou-se uniforme tanto no lado de tensão quanto no lado de compressão (Md=0 [0-0]).

Em função dos dados obtidos, o 4º dia foi escolhido para o estudo dos efeitos observados a partir do tratamento com Dipirona Sódica e Paracetamol. As características histológicas de presença de áreas hialínicas, diminuição da espessura do ligamento periodontal no lado de compressão e aumento no lado de tensão, reabsorção óssea frontal com a presença de clastos multinucleados podem ser conferidas pelas fotomicrografias referentes ao 4º dia de MDI (Fig. 6B; C; D) comparada a fotomicrografia de animais não submetidos a MDI com ligamento periodontal e osso alveolar normal (Fig. 6A).

Tabela 1: Análise histológica semi-quantitativa das raízes distovestibular, distolingual e intermediária do primeiro molar superior esquerdo de rato submetido a MDI.

	Tempo de Movimentação Dentária Induzida						
	Normal	6h	24h	4d	7d	11d	14d
Escore	0 [0-0]	0 [0-0]	1 [0-1]*	4 [3-4]*	3 [2-3]*	1 [1-2]*	0 [0-0]

A MDI foi realizada em ratos, através da inserção de uma mola entre o primeiro molar superior esquerdo e os incisivos. Os animais receberam 0,5 ml de salina uma hora antes da instalação do dispositivo. O sacrifício foi feito em diferentes intervalos de tempo (6 e 24 horas e 4, 7, 11 e 14 dias) após MDI. Os dados representam Mediana±valores extremos de 6 animais. Os parâmetros avaliados foram: presença de áreas hialínicas, osteoclastos, reabsorção óssea frontal e dentária; espaço do ligamento periodontal na área de compressão e normalidade de vasos sanguíneos. * $p < 0,05$ representa diferenças estatísticas dos animais submetidos a MDI em relação ao grupo controle (C) (Kruskal-Wallis; Dunn).

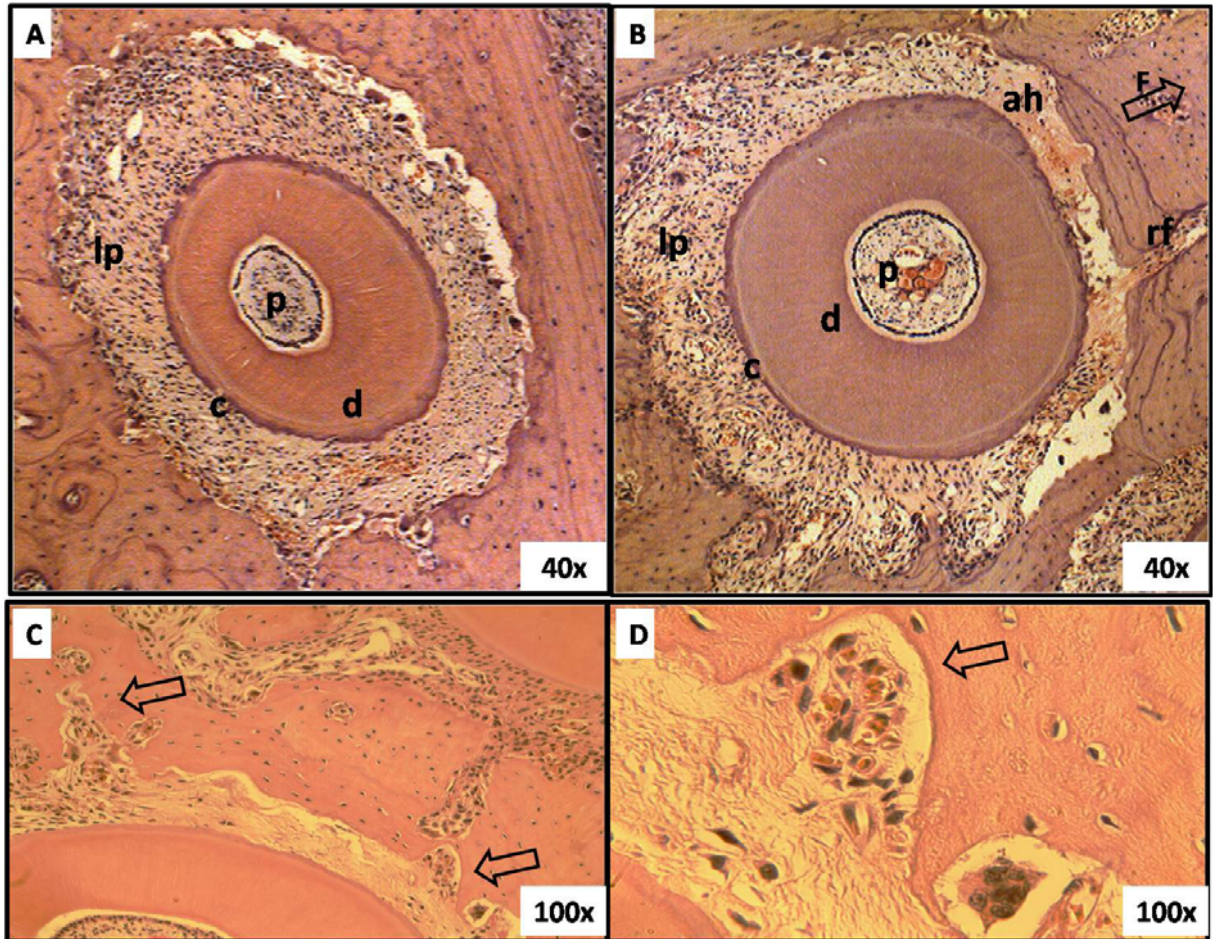


Figura 6: Fotomicrografias de cortes transversais das raízes distovestibulares de ratos submetidos a 4 dias de MDI (B, C e D) e de animais não submetidos a MDI com ligamento periodontal e osso alveolar normal (A): Os ratos foram submetidos à Movimentação Dentária Induzida pela inserção de uma mola de tração de NiTi entre o primeiro molar esquerdo superior, e os incisivos e no 4º dia foram sacrificados. Suas arcadas foram removidas, fixadas, descalcificadas em EDTA a 10% e foram realizados cortes transversais no terço cervical do 1º molar superior. **(A):** Ligamento periodontal e osso alveolar normal de uma raiz distovestibular, que receberam solução salina 0,9% (v.o) e não foram submetidos a MDI. **(B):** Ligamento periodontal e osso alveolar de uma raiz distovestibular de um animal submetido a MDI sacrificado no 4º dia após ativação do aparelho, mostrando áreas hialínicas (**ah**) no lado de compressão do **lp**, reabsorção frontal (RF) no mesmo sentido onde a força é aplicada (**F**+seta=sentido da força aplicada) e o espaço do LP reduzido no lado de compressão e aumentado no lado de tensão. Coloração HE; aumento de 40x. **c**= cimento; **d**= dentina; **p**= pulpa dentária; **lp**= ligamento periodontal; **o**= osso alveolar; **F**= direção da força. **(C):** Reabsorção óssea frontal (seta). **(D):** Osteoclasto e lacuna de reabsorção (seta) (Aumento de 40x e 100x)

C. Efeito da Dipirona Sódica (DIP) sobre ligamento periodontal e osso alveolar submetidos a MDI

O modelo de Movimentação Dentária Induzida (MDI), baseado em diversos autores (Heller & Nanda, 1979; Ren *et al.*, 2004; Davidovitch, 2006; Fracalossi *et al.*, 2009) e aprimorado no Laboratório de Farmacologia Oral – LFO/UFC, através da inserção de mola de tração de NiTi entre o primeiro molar superior esquerdo e os incisivos superiores, foi utilizado para o estudo dos efeitos da Dipirona Sódica, do Paracetamol ou Salina sobre os parâmetros avaliados no 4º dia. A tabela 2 mostra as alterações observadas na análise histológica semi-quantitativa nas raízes distovestibular, distolingual e intermediária de ratos submetidos a MDI. Os animais receberam via oral (v.o.) DIP (25; 75; 225 mg/kg), Paracetamol (200 mg/kg) e Salina (2 ml/kg) 30 minutos antes da instalação do dispositivo e por mais três dias, sendo sacrificados no 4º dia. A partir do corte transversal das raízes distovestibular, distolingual e intermediária, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos (DIP [4 (1-4); 4 (4-4); 4(3-4)]; PAR [4 (1-4)] e Salina [4 (3-4)]) quando comparados com o controle (C) [0 (0-0)]. Entretanto não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quando os grupos que receberam tratamento farmacológico (DIP ou PAR) foram comparados com os animais que receberam somente solução salina.

Esses achados podem ser observados na figura 7 onde são mostrados os aspectos histológicos dos animais submetidos à movimentação dentária induzida. A figura 7A mostra o aspecto normal do periodonto, enquanto que o periodonto dos animais submetidos à Movimentação Dentária Induzida (MDI) apresentou na zona de compressão do ligamento periodontal, zonas hialínicas, bem como áreas de reabsorção óssea, eventos essenciais para a movimentação dentária (Fig. 7B). No lado de tensão do ligamento periodontal observou-se estiramento das fibras, evento que contribuirá para a neoformação óssea. O periodonto dos animais tratados com Paracetamol (200 mg/kg) (Fig. 7C) demonstrou aspectos histológicos semelhantes aos animais do grupo salina. Analisando os animais tratados com DIP nas diferentes doses (25; 75 e 225 mg/kg) (Fig.7D; E; F), respectivamente, observou-se que o tratamento com DIP também apresentou características histológicas semelhantes ao grupo Salina e PAR quanto à presença de áreas hialínicas e às zonas de reabsorção.

Tabela 2: Análise histológica semi-quantitativa dos efeitos da Dipirona Sódica nas raízes distovestibular, distolingual e intermediária do primeiro molar superior esquerdo de rato submetido a MDI.

	Normal	Salina	PAR 200 (mg/kg)	DIP 25 (mg/kg)	DIP 75 (mg/kg)	DIP 225 (mg/kg)
Escores	0 (0-0)	4 (3-4) [†]	4 (1-4) [†]	4 (1-4) [†]	4 (4-4) [†]	4 (3-4) [†]

A MDI foi realizada através da inserção cirúrgica de uma mola de tração de NiTi entre o primeiro molar superior esquerdo e os incisivos dos ratos previamente anestesiados. Os animais receberam v.o. DIP (25; 75; 225 mg/kg), Paracetamol (200 mg/kg) e Salina (2 ml/kg) 30 minutos antes da instalação do dispositivo e diariamente por mais 4 dias. No 4º dia foi feito o sacrifício dos ratos e a remoção das hemiarcadas para a confecção dos cortes transversais seriados, processados para a coloração do método HE. Os dados representam Mediana±valores extremos de pelo menos 8 animais, onde as raízes distovestibular, distolingual e intermediária foram consideradas para análise dos seguintes parâmetros: presença de áreas hialínicas, presença de células clásticas (osteoclastos), uniformidade do espaço do ligamento periodontal, normalidade de vasos sanguíneos, presença de reabsorção óssea frontal e de reabsorção dentária (superfície cementária uniforme). [†]p<0,05 representa diferenças estatísticas entre os animais submetidos a MDI tratados com DIP (25, 75 e 225), PAR e Salina quando comparados a animais não submetidos a MDI, grupo controle (C) (Kruskal-Wallis; Dunn).

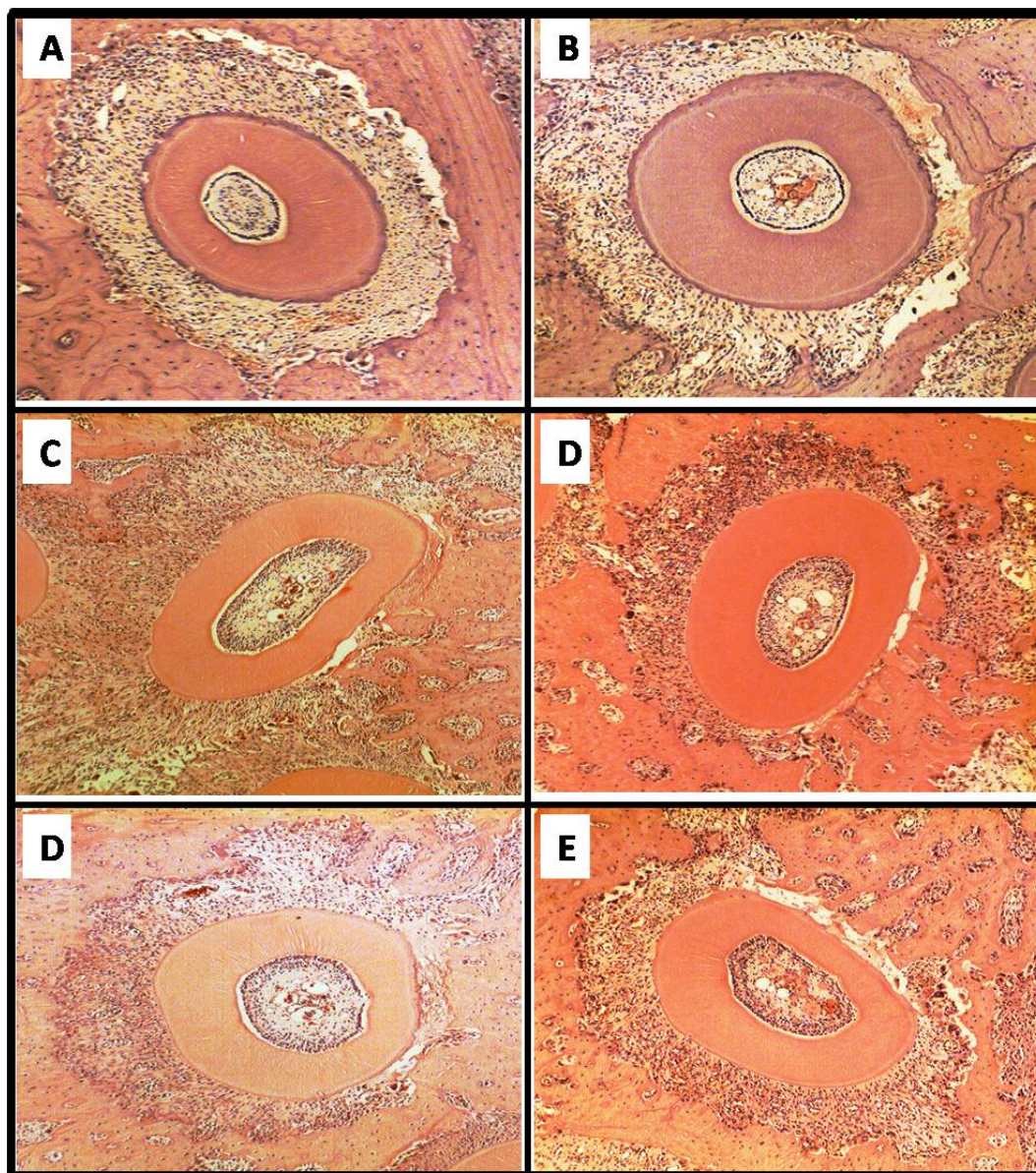


Figura 7: Fotomicrografias do periodonto normal de ratos: Normal (A), submetidos a MDI e que receberam salina (B), Paracetamol (200 mg/kg); Dipirona Sódica 25 mg/kg (D), 75 mg/kg (E) ou 225 mg/kg (F). Os ratos foram submetidos à MDI pela inserção de uma mola de NiTi entre o primeiro molar superior e o incisivo e no 4º dia foram sacrificados. Suas arcadas foram removidas, fixadas e descalcificadas em EDTA 10% tamponado. O terço cervical das raízes do primeiro molar foram analisadas. **(A)** Periodonto de animais normais não submetidos a MDI, mostrando ausência de: áreas hialínicas, células clásticas, reabsorção frontal ou reabsorção dentária, com ligamento periodontal uniforme e vasos sanguíneos normais. **(B):** Periodonto de animais que receberam solução salina 0,9% (v.o.) e foram submetidos a MDI, mostrando zona de compressão do ligamento periodontal, zonas hialínicas, bem como áreas de reabsorção óssea. **(C) (D) (E) (F):** Periodonto de animais submetidos a MDI e que receberam v.o. Paracetamol (200 mg/kg) e Dipirona Sódica (25; 75 e 225 mg/kg), respectivamente demonstrando aspecto histológico semelhante aos animais do grupo salina (Aumento de 40x)

D. Análise Histomorfométrica

A figura 8 mostra o efeito da Dipirona Sódica (DIP 25, 75 ou 225 mg/kg), Paracetamol (PAR 200 mg/kg) ou Salina 0,9%, administradas por via oral 30 minutos antes da inserção do dispositivo ortodôntico entre o primeiro molar superior e incisivos superiores de ratos, e após esta, diariamente até o 3º dia do período experimental, sobre a quantidade de áreas hialínicas no periodonto dos animais. Observou-se que a MDI, após o 4º dia, causou aumento de áreas hialínicas ($12,5 \pm 0,9$ %) quando comparado ao periodonto normal (0%), e não sendo alterado por PAR ($12,2 \pm 1,1$ %) ($p > 0,05$) ou pelas doses de Dipirona Sódica (DIP 25 = $10,7 \pm 0,7$ %; DIP 75 = $11,0 \pm 0,8$ %; DIP 225 = $10,8 \pm 1,0$ % ($p > 0,05$)).

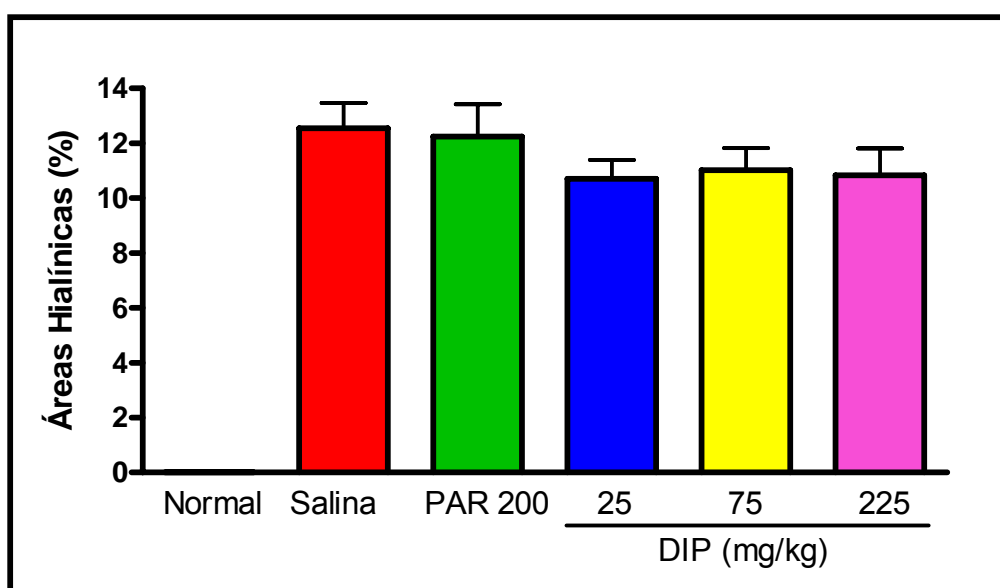


Figura 8: Efeito da Dipirona (DIP) sobre a quantidade de áreas hialínicas na MDI. DIP (25, 75 ou 225 mg/kg; v.o.), PAR (200 mg/kg; v.o.) ou salina (0,9%; v.o.) foram administradas diariamente a 30 minutos antes da MDI, através da inserção de dispositivo ortodôntico entre o primeiro molar e incisivos dos ratos. Os animais foram sacrificados 4 dias após o procedimento cirúrgico. A MDI causou surgimento de áreas hialínicas. As barras representam Média \pm EPM de, no mínimo 6 animais por grupo, após MDI. (Anova; Bonferroni).

E. Marcação Imunohistoquímica para TRAP

A figura 9 mostra o efeito da Dipirona Sódica (DIP 25, 75 ou 225 mg/kg), PAR (200 mg/kg) ou Salina 0,9%, administradas por via oral 30 minutos antes da inserção do dispositivo ortodôntico entre o primeiro molar superior e incisivos de ratos, e após esta, diariamente até o 3º dia do período experimental, sobre a marcação imunohistoquímica para detecção da expressão de TRAP, comparadas ao grupo Normal. Análises qualitativas revelaram que os animais normais, ou seja, não submetidos à MDI (Figura 9A) não apresentaram marcação positiva para esta enzima. Por outro lado, os animais do grupo Salina (Figura 9B), bem como os animais tratados com Paracetamol 200 mg/kg (Figura 9C) e Dipirona, nas doses de 25 mg/kg (Figura 9D), 75 mg/kg (Figura 9E) ou 225 mg/kg (Figura 9F) apresentam imunomarcação positiva para TRAP no lado de pressão do ligamento periodontal.

4.1.2. Parâmetros Bioquímicos dos ratos submetidos a MDI

A. Dosagem da mieloperoxidase gengival

A figura 10 mostra o efeito do tratamento com Dipirona Sódica (DIP) nas doses de 25, 75 ou 225 mg/kg, Paracetamol (PAR), na dose de 200 mg/kg, ou salina 0,9%, administradas por via oral 30 minutos antes da inserção do dispositivo ortodôntico entre o primeiro molar superior e incisivos de ratos, e após esta diariamente até o 4º dia do período experimental, sobre a liberação de MPO no tecido gengival subjacente à área desafiada. A MDI causou aumento da quantidade de MPO no tecido gengival dos animais quando comparada à de periodontos normais (9,54%). No grupo tratado com Paracetamol houve aumento de MPO semelhante ao grupo salina (95,29%). O tratamento com Dipirona Sódica em todas as em todas as três doses utilizadas provocou redução significativa ($p < 0,05$) da liberação de MPO (48,86%; 43,09%; 43,52%) no tecido gengival subjacente a área desafiada tanto quando comparado ao grupo salina quando ao grupo tratado com paracetamol.

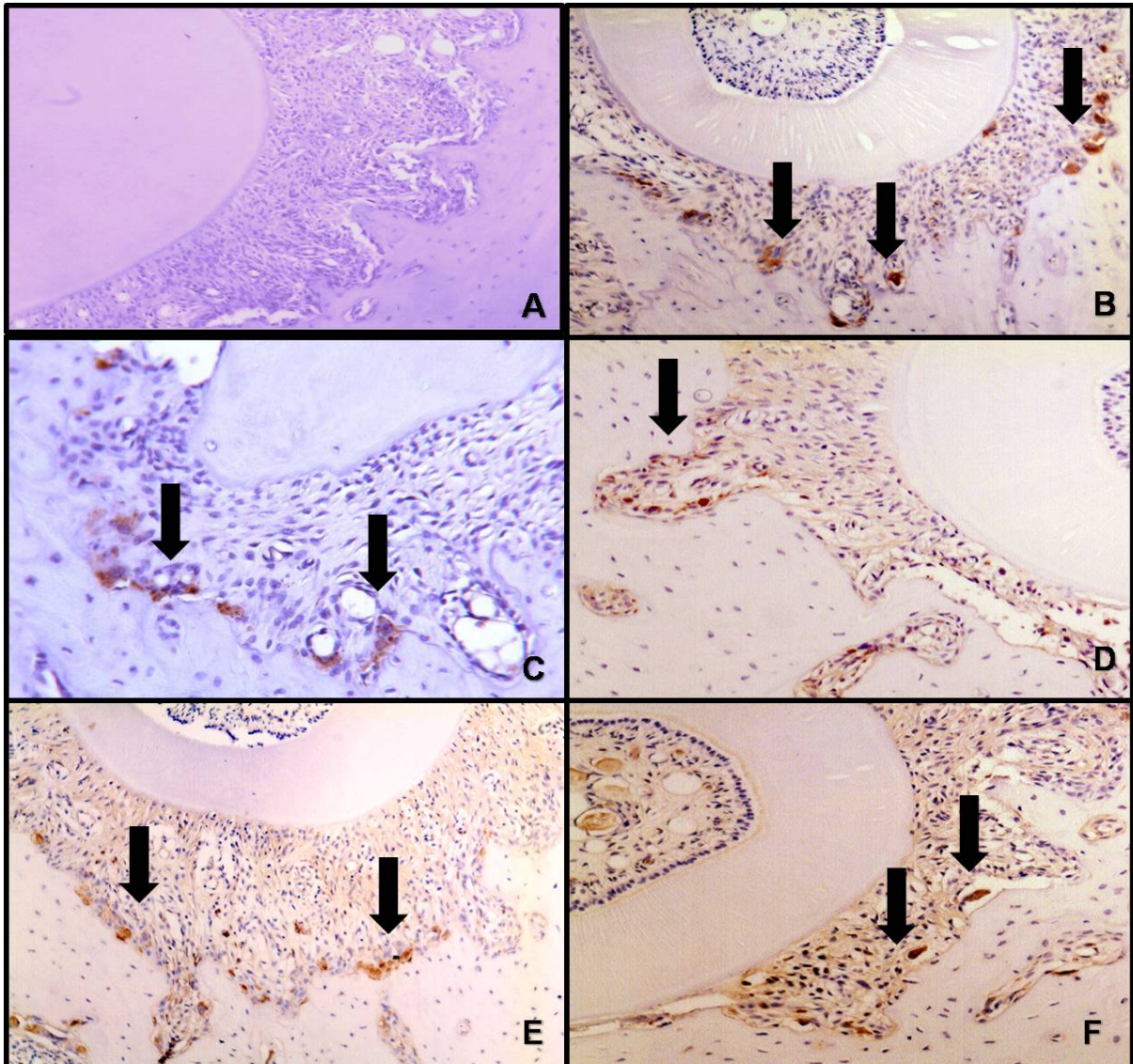


Figura 9: Fotomicrografias da detecção imunohistoquímica de da expressão TRAP no tecido periodontal de ratos: Normal (A), submetidos a MDI e que receberam salina (B), Paracetamol (200 mg/kg) (C); Dipirona Sódica 25 mg/kg (D), 75 mg/kg (E) ou 225 mg/kg (F). Os ratos foram submetidos à MDI pela inserção de uma mola de NiTi entre o primeiro molar superior e o incisivo e no 4º dia foram sacrificados. Suas arcadas foram removidas, fixadas e descalcificadas em EDTA 10% tamponado. A região periodontal nos lados de pressão do ligamento periodontal foram analisadas. **(A)** Periodonto de animais normais não submetidos a MDI, mostrando ausência de imunomarcção para TRAP. **(B):** Periodonto de animais que receberam solução salina 0,9% (v.o.) e foram submetidos a MDI, mostrando imunomarcção positiva para a expressão TRAP. **(C) (D) (E) (F):** Periodonto de animais submetidos a MDI e que receberam v.o. Paracetamol (200 mg/kg) e Dipirona Sódica (25; 75 e 225 mg/kg), respectivamente demonstrando imunomarcção positiva para TRAP (Aumento de 100x)

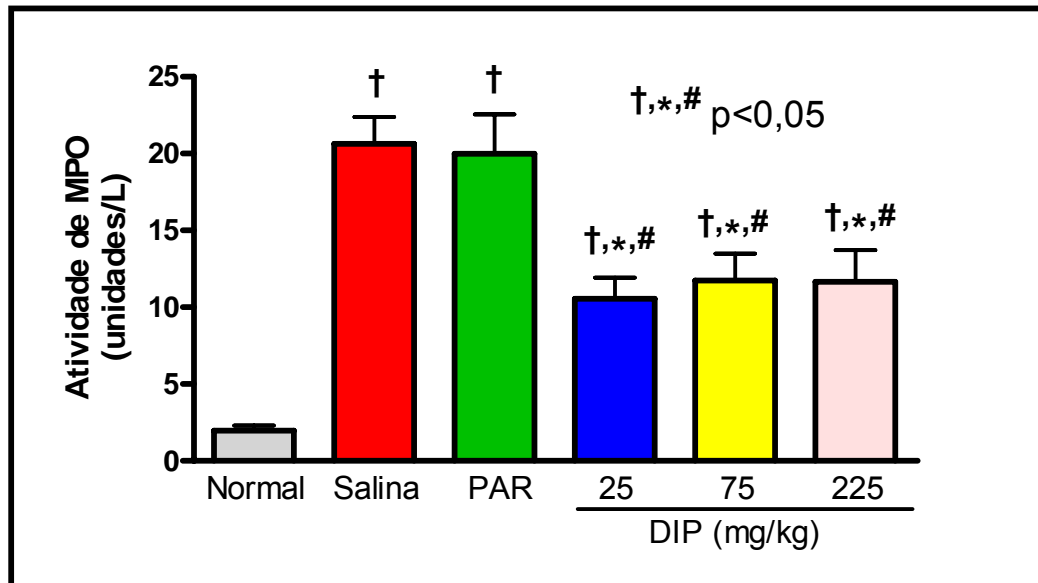


Figura 10: Efeito da Dipirona (DIP) sobre a atividade de MPO/mg de tecido gengival após MDI. DIP (25, 75 ou 225 mg/kg; v.o.), PAR (200 mg/kg; v.o.) ou salina (0,9%; v.o.) foram administradas diariamente a 30 minutos antes da MDI, através da inserção de dispositivo ortodôntico entre o primeiro molar e incisivos dos ratos. Os animais foram sacrificados 4 dias após o procedimento. As barras representam Média \pm EPM de, no mínimo 6 animais após MDI. † $p < 0,05$ indica diferença estatística dos animais que receberam solução salina, PAR e DIP nas diversas doses, em relação aos animais do grupo normal. * $p < 0,05$ indica diferença estatística dos animais que receberam DIP nas diversas doses, em relação aos animais que receberam apenas solução salina. # $p < 0,05$ indica diferença estatística dos animais que receberam DIP nas diversas doses, em relação aos animais que receberam PAR. O número de animais em cada grupo foi no mínimo de 6 (Anova, Bonferroni).

B. Efeito da Dipirona Sódica (DIP) sobre o metabolismo ósseo

B.1. Dosagem Sérica de Fosfatase Alcalina Óssea (FAO)

A figura 11 mostra o efeito do tratamento com Dipirona Sódica (DIP) nas doses de 25, 75 ou 225 mg/kg, Paracetamol (PAR), na dose de 200 mg/kg, ou salina 0,9%, administradas por via oral 30 minutos antes da inserção do dispositivo ortodôntico entre o primeiro molar superior e incisivos de ratos, e após esta diariamente até o 4º dia do período experimental sobre o metabolismo óssea analisado através da dosagem sérica de FAO. Observou-se que os valores basais de FAO (dia 0) de todos os grupos foram semelhantes entre si ($p > 0,05$). A MDI, por 4 dias, causou redução significativa de 54,29% dos níveis séricos de FAO quando comparado aos níveis basais ($p < 0,05$). Os animais tratados com PAR também apresentaram redução significativa de 62,37% dos níveis desta enzima. O tratamento com DIP, nas diversas doses, não reverteu a redução nos níveis de FAO (59,68%; 76,14% e 71,23%), 4 dias após MDI. Não houve diferenças significantes ($p > 0,05$) entre os grupos no 4º dia de experimento.

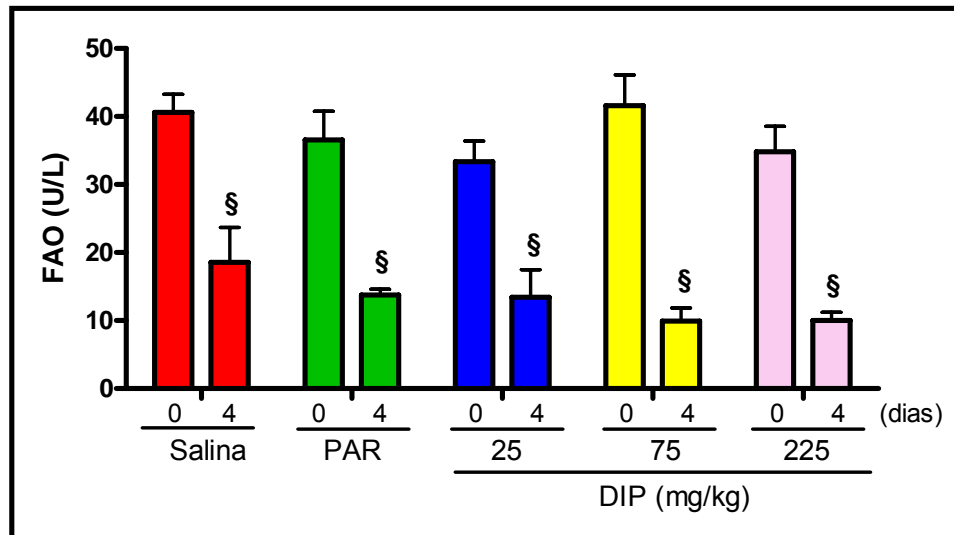


Figura 11: Efeito da Dipirona (DIP) sobre os níveis séricos de FAO antes e após MDI. DIP (25, 75 ou 225 mg/kg), PAR (200 mg/kg) ou salina (2 ml/kg) foram administradas v.o., diariamente a 30 minutos antes da MDI, através da inserção de dispositivo ortodôntico entre o primeiro molar e incisivos dos ratos. Os animais foram sacrificados 4 dias após o procedimento. As barras representam Média ± EPM de, no mínimo 6 animais antes e após MDI. § $p < 0,05$ indica diferença estatística dos animais que receberam Salina, PAR ou DIP nas diversas doses, em relação aos animais dos respectivos grupos no início do estudo. O número de animais em cada grupo foi no mínimo de 6. (Anova; Bonferroni; Teste t-Student).

4.1.3. Parâmetros Sistêmicos dos ratos submetidos a MDI

A. Efeito da Dipirona Sódica (DIP) sobre o Leucograma dos Ratos submetidos a MDI

A figura 12 mostra que a MDI, através da inserção de dispositivo ortodôntico entre o primeiro molar e incisivo superior esquerdo dos ratos, causou alterações significantes tanto na contagem total, como na contagem diferencial de leucócitos de sangue periférico. Tal alteração caracterizou-se por uma leucocitose no 4º dia (Fig. 12A) às custas de aumento no número de neutrófilos ($p < 0,05$) (Fig. 12B). Houve uma tendência ao aumento do número de mononucleares, entretanto sem significância estatística (Fig. 12C). No grupo tratado com PAR houve aumento significativo de leucócitos quando comparado ao dado basal (Fig. 12A), também marcada neutrofilia no 4º dia (Fig. 12B). Houve tendência de aumento de mononucleares sem significância estatística quando comparado ao dado basal (Fig. 12C). O tratamento com DIP das diversas doses preveniu, de forma significativa ($p < 0,05$) a leucocitose (Fig. 12A) e a neutrofilia (Fig. 12B) observadas nos grupos salina e PAR no 4º dia de experimentação. Apesar da tendência de aumento de mononucleares, não houve diferença significativa quando comparado aos dados basais, ou quando os animais tratados com DIP, nas diversas doses, foram comparados aos outros grupos experimentais no 4º dia (Fig. 12C).

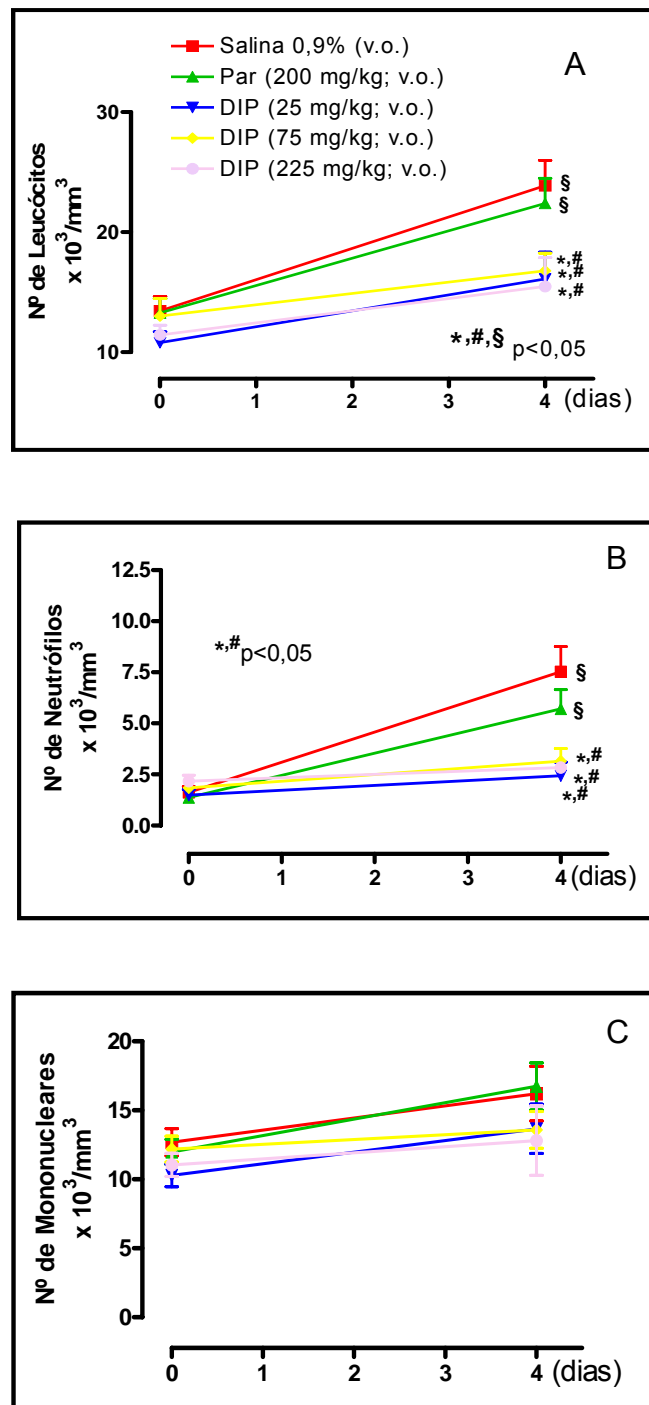


Figura 12: Efeito da Dipirona (DIP) sobre o leucograma dos ratos submetidos a MDI. A Movimentação dentária foi induzida através da inserção de dispositivo ortodôntico entre o primeiro molar e incisivos dos ratos. O sangue colhido das caudas dos animais imediatamente antes da cirurgia e no 4º dia. Os pontos representam Média \pm EPM do número total de leucócitos (A), neutrófilos (B), mononucleares (C) $\times 10^3/\text{mm}^3$. O número de animais utilizado em cada grupo foi de no mínimo cinco (Anova, Bonferroni).

B. Efeito da Dipirona Sódica (DIP) sobre as Enzimas Hepáticas dos Ratos submetidos a MDI

B.1. Transaminase Glutâmico Oxalacética - TGO

A figura 13 A mostra o efeito do tratamento com Dipirona Sódica (DIP) nas doses de 25, 75 ou 225 mg/kg, Paracetamol (PAR) na dose de 200 mg/kg ou salina 0,9%, administradas por via oral 30 minutos antes da inserção do dispositivo ortodôntico entre o primeiro molar superior e incisivos de ratos, e após esta diariamente até o 4º dia do período experimental sobre a Transaminase Glutâmico Oxalacética (TGO). Não se observou diferenças significantes com relação ao nível sérico de TGO nos diferentes grupos quando do início do experimento. A MDI não provocou alteração dos níveis séricos de TGO em animais submetidos à MDI durante 4 dias, assim como os tratamentos com PAR ou com DIP, nas diversas doses, não causaram aumento significativo dos níveis séricos de TGO.

B.2. Transaminase Glutâmico Pirúvica - TGP

A figura 13 B mostra o efeito do tratamento com Dipirona Sódica (DIP) nas doses de 25, 75 ou 225 mg/kg, Paracetamol (PAR) na dose de 200 mg/kg ou salina 0,9%, administradas por via oral 30 minutos antes da inserção do dispositivo ortodôntico entre o primeiro molar superior e incisivos de ratos, e após esta diariamente até o 4º dia do período experimental sobre a Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP). Não se observou diferenças significantes com relação ao nível sérico de TGP nos diferentes grupos quando do início do experimento. A MDI não provocou alteração dos níveis séricos de TGP. Os animais tratados com PAR também não apresentaram alterações significantes dos níveis desta enzima. O tratamento com DIP, nas diversas doses, não causou aumento dos níveis séricos de TGP. Não houve diferenças significantes ($p > 0,05$) entre os grupos no 4º dia de experimento.

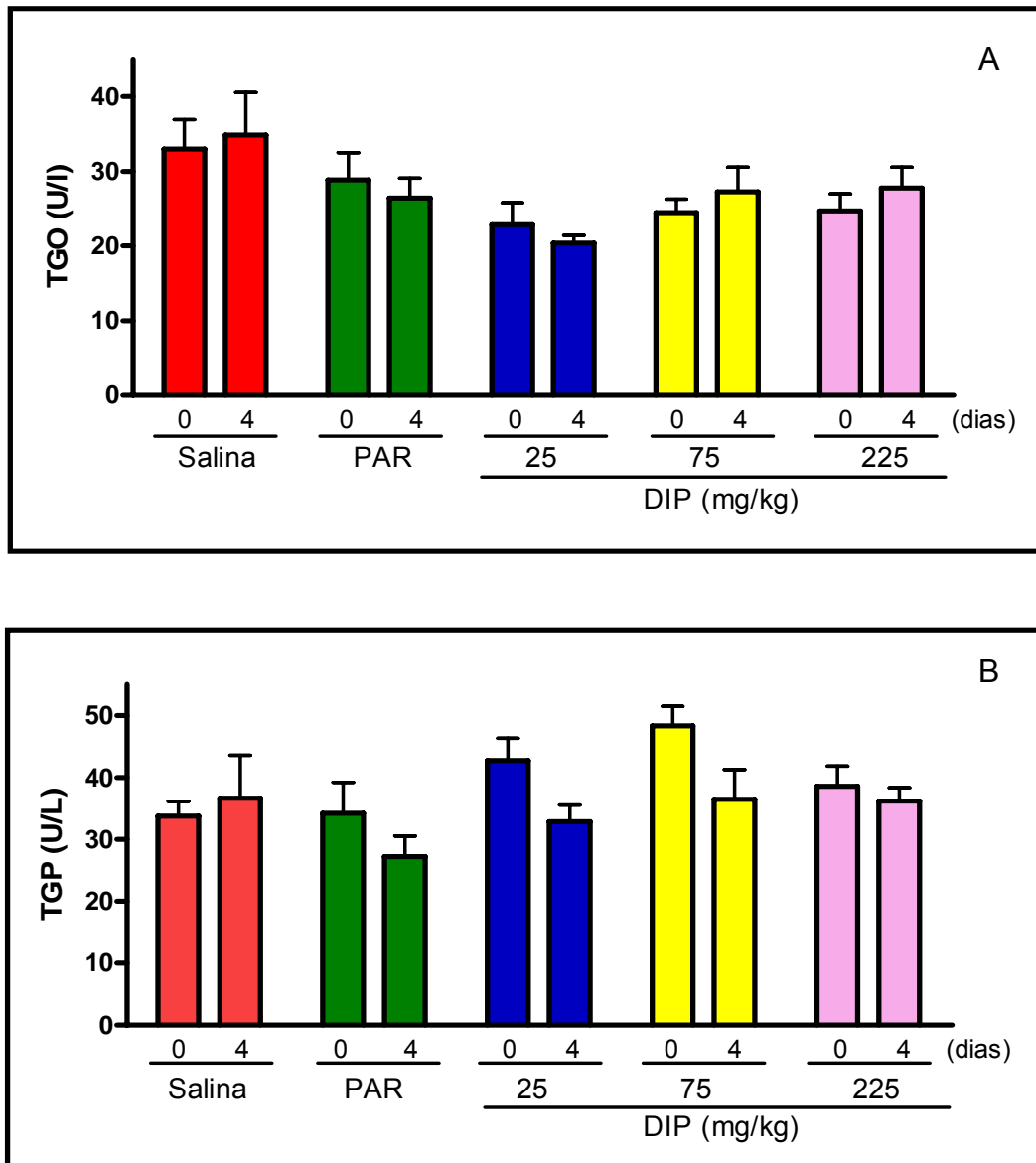


Figura 13: Efeito da Dipirone (DIP) sobre os níveis séricos de TGO (A) e TGP (B) antes e após MDI. DIP (25, 75 ou 225 mg/kg), PAR (200 mg/kg) ou salina (2 ml/kg) foram administradas v.o., diariamente a 30 minutos antes da MDI, através da inserção de dispositivo ortodôntico entre o primeiro molar e incisivos dos ratos. Os animais foram sacrificados 4 dias após o procedimento. As barras representam Média \pm EPM de, no mínimo 6 animais antes e após MDI. O número de animais utilizado em cada grupo foi de no mínimo seis (Anova; Bonferroni; Teste t-Student).

C. Efeito da Dipirona Sódica (DIP) sobre a Variação de Massa Corpórea dos Ratos submetidos a MDI.

A figura 14 mostra que a MDI em ratos que receberam salina 0,9% (v.o.) apresentaram perda não significativa ($p>0,05$) de massa corpórea a partir do primeiro dia após a instalação do dispositivo ortodôntico quando comparado ao dia 0, mantendo esse perfil até o 2º dia, quando então os animais começaram a mostrar tendência a ganho de massa sem, no entanto, acompanhar a curva de peso dos animais normais. O tratamento com Paracetamol (200 mg/kg; v.o.) não reverteu a perda de massa corpórea de animais induzida nos primeiros dias de MDI, quando comparado à variação de massa corpórea de animais do grupo salina. Da mesma forma, o tratamento com Dipirona, nas diversas doses utilizadas (25, 75 e 225 mg/kg; v.o.) também não reverteu a perda de massa corpórea de animais induzida nos primeiros dias de MDI, quando comparado à variação de massa corpórea de animais do grupo salina. No entanto, a partir do segundo dia de tratamento parece haver uma tendência à recuperação de suas massas, embora sem haver diferença estatisticamente significativa quando relacionada às massas dos animais controle, ou seja, grupo salina e Paracetamol.

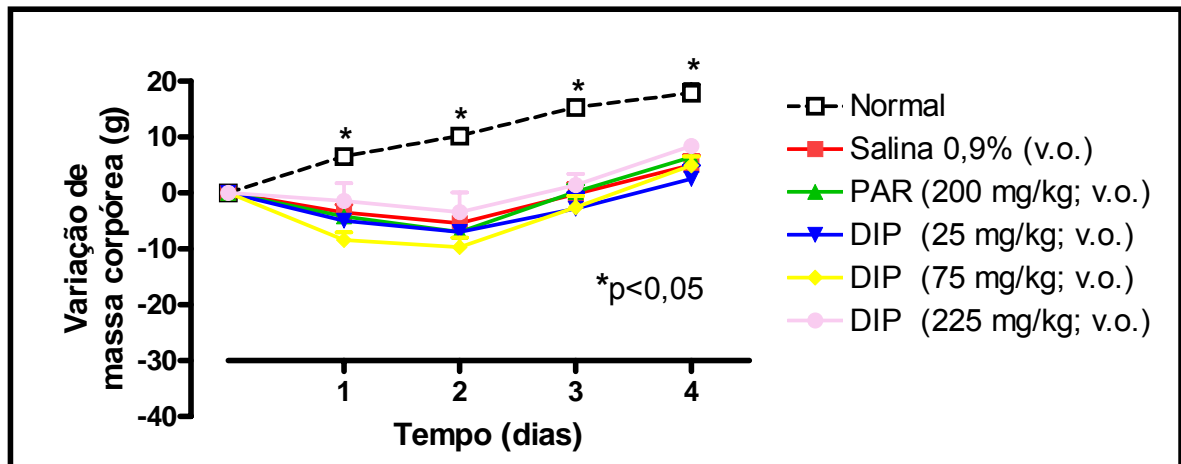


Figura 14: Efeito da Dipirona (DIP) sobre os níveis séricos de TGP antes e após MDI. DIP (25, 75 ou 225 mg/kg; v.o.), PAR (200 mg/kg; v.o.) ou salina (0,9%; v.o.) foram administradas diariamente a 30 minutos antes da MDI, através da inserção de dispositivo ortodôntico entre o primeiro molar e incisivos dos ratos. Os animais foram sacrificados 4 dias após o procedimento cirúrgico. A massas corpóreas dos animais foram medidas imediatamente antes da cirurgia e após esta, diariamente durante 4 dias. Os pontos representam Média±EPM da variação de massa corpórea (g), calculada através das diferenças das massas dos animais em relação à massa inicial. * $p<0,05$ representa diferenças estatísticas entre os animais submetidos a MDI que receberam solução salina ou tratamento com PAR ou DIP nas diversas doses, quando comparado aos animais normais. O número de animais em cada grupo foi no mínimo de 6. (Anova; Bonferroni)

5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade da Dipirona Sódica na remodelação óssea durante a movimentação dentária induzida, visto que os mecanismos biológicos de perda óssea estão associados aos mecanismos biológicos da inflamação. Para tanto, foi utilizado o modelo de movimentação dentária induzida (MDI) em ratos.

O modelo de MDI é de extrema importância não apenas para a Ortodontia, mas também para especialidades médicas dedicadas ao estudo de doenças ósseas ou para avaliações ósseas quanto à repercussão de medicamentos (Martins-Ortiz, 2004). De fato, a maioria dos estudos é realizada em animais visto que a avaliação experimental em animais apresenta vantagens numericamente representativas, quando comparada à avaliação em humanos. A análise microscópica do movimento dentário induzido em humanos é limitada, uma vez que esta requer exodontias e, portanto, as fibras do ligamento periodontal são rompidas, consequentemente as alterações teciduais decorrentes da movimentação não podem ser analisadas (Von Böhl *et al.*, 2009). Além disso, o modelo murino está entre os mais utilizados e universalmente aceitos considerando: a morfologia radicular favorável, as proporções no tamanho dos molares, as peculiaridades anatômicas e o metabolismo mais acelerado, o baixo custo e o fato de ser passível de extrapolação para os seres humanos (Consolaro, 2007).

Muitos desenhos de aparelhos ortodônticos são encontrados conforme o tipo de aparelho empregado na movimentação dentária induzida experimentalmente. Os aparelhos escolhidos nos experimentos com MDI influenciam o grau de observação microscópica, independentemente se houver associação ou não com o uso de agentes farmacológicos. Em animais, os aparelhos em forma de “V”, indicados para separação de incisivos (Arias & Marquez-Orozco *et al.*, 2006; Stabile *et al.*, 2009), e os elásticos, introduzidos entre o primeiro e o segundo molares superiores, exercem uma força rapidamente dissipante, porém pouco eficiente e de forma não-contínua, pois atua sobre dois dentes, ao invés de apenas em um. Além disso, tal força é absorvida por uma considerável deflexão das cristas e septos ósseos de dois dentes, e não apenas de um (Waldo & Rothblatt, 1954; Ohkawa, 1982). Os parafusos expansores, entre os primeiros molares superiores, promovem

a vestibularização destes dentes (Igarashi *et al.*, 1994, 1996). As molas transversais de vestibularização dos molares atuam tanto nos dentes quanto na sutura palatina, sem uma determinação segura da proporção em que isso ocorre.

Por outro lado, as molas distendidas entre os incisivos e os molares com o objetivo de mesializar os molares, tal como o utilizado neste trabalho, são atualmente considerados os modelos predominantes, uma vez que permitem a padronização e quantificação das forças utilizadas no modelo experimental, conferindo, assim, maior credibilidade na extrapolação dos resultados obtidos (Heller & Nanda, 1979; Mohammed *et al.*, 1989; Pereira, 1995; Mazziere, 1999; Vasconcelos, 1996; Martins-Ortiz, 2004; Ren *et al.*, 2004; Fracalossi *et al.*, 2007).

A partir da seleção do tipo de dispositivo ortodôntico, houve a necessidade de determinação do período de utilização deste dispositivo para observação histológica de áreas hialínicas, indicador de necrose tecidual. Com base na curva do efeito histológico da MDI sobre ligamento periodontal e osso alveolar durante 14 dias, o 4º dia foi então escolhido, com base nas características histológicas de: presença de grandes áreas hialínicas, osteoclastos justapostos à superfície e presença de lacunas de reabsorção, ligamento periodontal com espessura diminuída, vasos sanguíneos congestos, tecido ósseo frontal irregular com cavidades reabsortivas e ausência de reabsorção dentária. Este dado corrobora os achados microscópicos de outros autores, os quais afirmam que a visualização de áreas hialínicas pode ocorrer desde o terceiro dia estendendo-se até o quinto dia (Tomizuka *et al.*, 2007).

Desta forma, confirmando outros achados microscópicos descritos na literatura, no quarto dia de movimentação, é possível observar áreas de hialinização no lado de pressão do ligamento periodontal, estiramento das fibras no lado de tensão e discreta reabsorção óssea frontal com a presença de lacunas de reabsorção (Miyoshi *et al.*, 2001; Hamaya *et al.* 2002; Martins-Ortiz, 2004; Tomizuka *et al.*, 2007; Von Böhl *et al.*, 2009; Fracalossi *et al.*, 2009). Ainda, em consonância com estes autores, observa-se que ao 7º dia, as áreas hialínicas mostraram-se reduzidas e em franco processo de fagocitose por macrófagos, células da linhagem hematopoiética responsáveis pela remoção do tecido hialinizado (Brudvik & Rygh, 1993a).

A MDI é um processo que se dá por meio de estímulo mecânico, advindo de forças liberadas por dispositivos ortodônticos, que promove a quebra da

integridade celular e tecidual, transformando este estímulo em evento biológico, conhecido como mecanotransdução. Esta movimentação resulta na formação de áreas de pressão e tensão do ligamento periodontal sobre o osso alveolar. A remodelação óssea e o deslocamento dentário são resultantes do estresse celular e de eventos inflamatórios que envolvem principalmente os clastos, bem como osteoblastos, cementoblastos, fibroblastos, além de mediadores como as citocinas, os fatores de crescimento e os produtos do ácido araquidônico (Davidovitch *et al.*, 1994).

No estresse celular induzido pela deformação do citoesqueleto associado à hipóxia resultante da compressão do ligamento periodontal, ocorre a produção de cininas seguido por prostanóides, onde se destacam as prostaglandinas (PGs). Estudos sobre movimentação ortodôntica mostraram que as PGs, em especial a PGE₂, foram capazes de promover osteoclastogênese por regular positivamente a expressão de ligante do receptor ativador de fator de transcrição nuclear (RANKL) no ligamento periodontal (Kanzaki *et al.*, 2002), molécula essencial no processo de reabsorção óssea. Ademais, outros mediadores pró-inflamatórios, que também promovem a osteoclastogênese, são estimulados pelas PGs, dentre eles destacam-se as interleucinas (IL) -1, -6, -11, -13 e o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) (Shimizu *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1996).

As cininas, no entanto, reconhecidamente induzem dor nas terminações nervosas livres, as quais são potencializadas pela ação das PGs. Estudos realizados por Krishnan (2007) demonstraram que sítios de movimentação dentária têm sido associados a eventos hiperálgicos e que a dor é uma condição frequente em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico, sendo considerada a principal causa de descontinuação do tratamento. Dessa forma, existe uma associação direta entre o uso de analgésicos e o tratamento ortodôntico.

Diversos estudos e revisões têm demonstrado a capacidade do Paracetamol em não interferir na MDI (Bartzela *et al.*, 2009; Gonzales *et al.*, 2009; Stabile *et al.*, 2009; Arias & Marquez-Orozco, 2006; Walker & Buring, 2001; Roche *et al.*, 1997; Kehoe *et al.*, 1996), justificando o uso desse fármaco como analgésico de escolha. Em contrapartida, não há trabalhos de nosso conhecimento envolvendo o analgésico Dipirona Sódica na MDI, mesmo já estando há mais de 51 anos no mercado brasileiro sendo, inclusive, um dos medicamentos mais vendido dentro de sua classe (analgésicos).

Nesse contexto, os resultados obtidos neste estudo demonstraram pela primeira vez o efeito da Dipirona Sódica na Movimentação Dentária Induzida em ratos. Observou-se que a Dipirona Sódica, nas suas diversas doses, não alterou as características histológicas observadas tanto no grupo que recebeu solução Salina quanto no grupo que recebeu Paracetamol. Apesar de não haver dados na literatura sobre o efeito da Dipirona Sódica na movimentação dentária, outros autores confirmam os achados histológicos observados durante a MDI tais como; compressão de células do ligamento periodontal (Shirazi *et al.*, 2002; Kohno *et al.*, 2003; Krishnan & Davidovitch, 2006a), zonas de hialinização e lacunas de reabsorção contendo osteoclastos nas superfícies alveolares contíguas às áreas hialinas (Reitan & Kvam, 1971; Krishnan & Davidovitch, 2006a)

Na ortodontia muito se discute sobre áreas de hialinização. Estas nada mais são do que uma reação tecidual não desejável que provoca o aparecimento de uma zona necrótica estéril no tecido, decorrente de hipóxia quando da instituição de uma força compressiva (von Böhl & Kuijpers-Jagtman, 2009). No lado de pressão do ligamento periodontal (LP) os eventos biológicos iniciam-se com o distúrbio da corrente sanguínea, que leva à morte celular (hialinização), seguida de reabsorção das áreas hialinizadas por macrófagos, e reabsorção óssea por osteoclastos próximo do tecido hialinizado, resultando em movimentação dental (von Böhl & Kuijpers-Jagtman, 2009). Portanto, apesar de a presença de áreas hialínicas ser um fator importante para a indução do processo reabsortivo que culmina em movimentação dental, um aumento exacerbado desta característica histológica pode também reduzir a taxa de movimentação dental, pois os macrófagos necessitam inicialmente reabsorver as áreas hialínicas para depois reabsorver osso, ou também estar associada a desregulação da reabsorção, causando reabsorção radicular (von Böhl & Kuijpers-Jagtman, 2009).

Desta forma, através da análise histomorfométrica, foi visto que o grupo que recebeu Dipirona Sódica, nas diferentes doses, apresentou percentual semelhante de áreas hialínicas, quando comparado aos grupos Salina ou Paracetamol. Estudos mostram que durante a movimentação ortodôntica, a estrutura normal e organização no lado de pressão do LP são as primeiras características a serem perdidas e que este evento é acompanhado por uma estagnação na movimentação dentária. Em seguida, o tecido necrosado, resultante da hipóxia causada pela compressão do ligamento, é, então, destruído por fagocitose. Neste

processo, um influxo de células fagocíticas como: macrófagos, células gigantes, fibroblastos e pré-osteoclastos, provenientes das áreas adjacentes não danificadas, invadem e eliminam o tecido hialinizado, tornando o movimento dentário ortodôntico possível (Rygh, 1972, 1973, 1974a, b, 1977; Rygh *et al.*, 1986; Brudvik & Rygh, 1991, 1993a,b, 1994a,b, 1995). Portanto, a identificação e quantificação da hialinização no ligamento periodontal representa uma das reações e respostas teciduais mais importantes em pesquisas sobre MDI (Kohno *et al.*, 2002), uma vez que seu efeito indica a eficácia da força e a ocorrência do movimento dentário (Von Böhl *et al.*, 2004).

Assim, os resultados obtidos através das análises histológica e histomorfométrica, demonstraram similaridade entre o efeito dos fármacos, Paracetamol e Dipirona, em não influenciar o desenvolvimento de alterações teciduais após indução da movimentação ortodôntica. Diversos autores, que anteriormente estudaram o efeito do Paracetamol na movimentação dentária, observaram que este fármaco não interfere na MDI por ser um pobre inibidor de prostaglandinas (PGs) (Bartzela *et al.*, 2009; Gonzales *et al.*, 2009; Stabile *et al.*, 2009; Gameiro *et al.*, 2007; Arias & Marquez-Orozco, 2006; Walker & Buring, 2001; Roche *et al.*, 1997; Kehoe *et al.*, 1996). As PGs, em especial a PGE₂, interagem com os receptores de membrana dos osteoblastos na superfície óssea e esta interação induz à mobilização de células clásticas para a superfície óssea (Rygh *et al.*, 1986). Existem evidências que as estas PGs são liberadas quando células do LP são deformadas mecanicamente (Rodan *et al.*, 1989). Seifi *et al.* (2003) observaram uma aumento na taxa de movimentação dentária em ratos que receberam PGE₂ durante MDI em relação ao grupo controle. Outro estudo demonstrou que a superexpressão de RANKL em um ligamento periodontal mecanicamente estressado é mediada pela PGE₂ (Kanzaki *et al.*, 2002).

Os achados desse estudo mostraram que a Dipirona apresentou características histológicas e histomorfométricas semelhantes ao grupo tratado com Paracetamol. Dipirona e Paracetamol são fármacos classificados como anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). A maioria dos AINES exibe uma tríade de atividades terapêuticas – anti-inflamatória, antipirética e analgésica - e também reduzem a biossíntese de prostaglandinas (PGs) por inibir enzimas ciclooxigenases (COX) (COX-1, COX-2 ou ambas) (Vane, 1971; Vane *et al.*, 1998). No entanto, o diferencial do Paracetamol e da Dipirona é de que, ambos apresentam atividade

antipirética e analgésica, porém, possuem fraca atividade anti-inflamatória (Batu & Erol 2007) e são fracos inibidores de COX-1 e -2 (Botting, 2000; Graham & Scott, 2003), corroborado pelo estudo de Chandrasekharan *et al.* (2002).

O mecanismo de ação do Paracetamol tem se consolidado na ação sobre COX-3, uma porção variante de COX-1 encontrada no córtex cerebral humano que possui baixa atividade antiinflamatória porém, é capaz de interferir no mecanismo de bloqueio da dor e febre. Observou-se que à concentração constante de Paracetamol, após doses terapêuticas, apenas COX-3 é preferencialmente inibida. Os mecanismos de ação da Dipirona Sódica, por sua vez, ainda permanecem controversos. Diversos autores sustentam a idéia que o fármaco bloqueia a síntese de PG periférica (Ferreira & Nakamura, 1979; Granados-Sotos *et al.*, 1993; Tonussi & Ferreira, 1994), outros, por sua vez, admitem ação do fármaco pela via serotoninérgica ou associada ao sistema opióide (Kiliç & Erol, 2000), enquanto que muitos autores foram incisivos em afirmar que o mecanismo analgésico da Dipirona possa envolver uma combinação de ações de vias periféricas e centrais (Shimada *et al.*, 1994; Vanegas & Tortorici, 2002; Genç *et al.*, 2003; Onkol *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Nossaman *et al.*, 2007; Genç *et al.*, 2009). Porém, a partir do ano 2000, vários autores, passaram a sugerir que o mecanismo de ação da Dipirona possa se assemelhar ao do Paracetamol por envolver a inativação da COX-3 (Chandrasekharan *et al.*, 2002). Neste estudo, os autores compararam o efeito da Dipirona e do Paracetamol e constatou-se a capacidade de ambos os fármacos em inibir a enzima COX-3 mais do que as isoformas COX-1 e COX-2. O paracetamol inibiu COX-3 com valor de IC₅₀ de 460 µM, enquanto que Dipirona inibiu COX-3 com um valor de IC₅₀ de 52 µM e COX-1 em concentração 6,6 vezes maior. Especificamente em relação à Dipirona, não se detectou inibição de COX-2 abaixo de 1 mM.

A Dipirona é uma pró-droga que, em solução aquosa, espontaneamente se fragmenta em compostos estruturalmente relacionados à Pirazolona, dentre eles destacam-se, a Antipirina e Dimetilaminopirina. Estes dois compostos também mostraram inibir preferencialmente COX-3 (Chandrasekharan *et al.*, 2002). Corroborando os achados prévios, Ayoub *et al.* (2006) mostraram que os compostos derivados da Dipirona reduziram de forma significativa a contorção induzida pela administração intraperitoneal de iloprost (análogo sintético de prostaciclina), e mediada centralmente. Tal redução foi acompanhada pela diminuição na biossíntese

de PGE₂ cerebral por ambos os compostos (Ayoub *et al.*, 2006). A ação analgésica dos compostos da Dipirona baseia-se no fato de que após doses terapêuticas o produto ativo derivado da quebra da molécula de Dipirona atinge concentrações de 104 µM e 86 µM no plasma e sistema nervoso central, respectivamente (Cohen O *et al.*, 1998), as quais inibem preferencialmente COX-3 (Chandrasekharan *et al.*, 2002).

Sabe-se que a movimentação ortodôntica promove remodelação de osso alveolar, a qual é mediada por reações inflamatórias, caracterizadas por mudanças vasculares e infiltração de leucócitos (Burke *et al.*, 2002; Apajalahti *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2003; Ingman *et al.*, 2005; Perinetti *et al.*, 2005). Os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), primeiras células a infiltrar no tecido, são compostos por grânulos azurofílicos que contém a enzima mieloperoxidase (MPO), importante para a defesa do tecido (Miyasaki & Nemirovsky, 1997).

Quando os neutrófilos são ativados em contato com um estímulo, eles iniciam uma explosão respiratória, pelo consumo de oxigênio molecular (O₂), resultando na formação de um radical superóxido (O₂⁻), via ativação de NADPH oxidase (Quinn & Gauss, 2004; Weiss, 1989; Yang & Hill, 1991; Babior, 2004), cuja função é de prover espécies reativas de oxigênio (ROS). O O₂⁻, importante produto primário para a produção de ROS, é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Babior, 2004). O H₂O₂ não é um composto reativo, no entanto, pode ser transformado em um produto altamente reativo e deletério através da interação com a MPO, gerando ácido hipocloroso (HOCl), após oxidação de íons cloro (Cl⁻), contribuindo consideravelmente para a atividade de PMNs.

Assim, tem sido estabelecido que, o nível de atividade de MPO está diretamente relacionado à atividade de PMNs (Cao & Smith, 1989; Yamalik *et al.*, 2000; Kaner *et al.*, 2006). Portanto, a determinação de MPO pode ser uma ferramenta valiosa para acessar o grau de inflamação tecidual. Isto é particularmente interessante durante a movimentação dental que, quando da aplicação de uma força, ocorre migração de PMNs para o tecido, (Lowney *et al.*, 1995) onde lá, exerceram suas funções liberando MPO.

Neste estudo, observou-se que MDI causou aumento da atividade de mieloperoxidase (MPO) quando comparado aos valores basais. O aumento da atividade de MPO não foi revertido nem no grupo Paracetamol, nem nos grupos de animais tratados com Dipirona Sódica, nas diversas doses. No entanto, o aumento

de MPO no grupo DIP não foi semelhante ao observado nos grupos Salina e Paracetamol.

Marcaccini *et al.* (2010) corroboram os achados deste estudo, mostrando aumento da atividade de MPO no fluido crevicular gengival e saliva após aplicação de força ortodôntica. O fato de o Paracetamol também não afetar a atividade de MPO foi demonstrado por outros dados na literatura (Marquez & Dunford, 1993; Sánchez *et al.*, 2002). Marquez & Dunford, (1993) inclusive mostraram que o Paracetamol tem um efeito dual e dose-dependente sobre a atividade dessa enzima. A MPO nativa utiliza H_2O_2 para oxidar Cl^- , em HOCl, um potente agente oxidante, através da ação do componente I (C-I) da MPO. Dois outros intermediários da MPO, C-II e -III são produzidos, porém são inativos para a reação de cloração, ou seja, oxidação do íon cloro. O acúmulo de C-II e -III leva a supressão da formação de HOCl. O composto I da MPO tem meia-vida curta, e na ausência de Cl^- é rapidamente reduzido a composto II (Marquez & Dunford, 1993). O Paracetamol, por sua vez, é capaz de reduzir o C-II à MPO nativa, de forma rápida, provocando aumento na taxa de cloração (Marquez & Dunford, 1993). No entanto, esta reação segue uma cinética de saturação. O acúmulo de C-II reduz a cloração sob altas concentrações de Paracetamol, pois menos C-I estará disponível para a oxidação de Cl^- à HOCl. Além disso, o Paracetamol, em altas concentrações pode competir com Cl^- , reduzindo C-I à C-II, enquanto que em baixas concentrações, o Cl^- parece ser um melhor substrato. Portanto, sob concentrações terapêuticas, o Paracetamol não afeta a atividade de MPO (Marquez & Dunford, 1993).

No grupo tratado com Dipirona, apesar de não ter havido intensa elevação dos níveis de MPO, estes foram significativamente maiores que os valores basais. Este efeito corrobora outros achados os quais mostraram que, a administração de Dipirona não afetou a atividade de MPO induzida por CFA (complete Freund's adjuvant), um agente pró-inflamatório, em modelo de dor inflamatória (Sauzem *et al.*, 2009). Em modelos de úlcera gástrica induzida por ácido clorídrico observou-se redução, porém não significativa, do aumento da atividade de MPO, após o tratamento com Dipirona (Sánchez *et al.*, 2002; Berenguer *et al.*, 2004). Por outro lado, a explicação para a diferença da atividade de MPO entre Paracetamol e Dipirona reside no fato de que a Dipirona pode interferir na formação das espécies reativas de oxigênio, causando impedimento de explosão neutrofílica.

Tal efeito pode se benéfico em caso de ativação excessiva de neutrófilos (Costa *et al.*, 2006).

Durante o processo de reabsorção óssea, os osteoclastos ativos, mostram alta concentração de fosfatase ácida tártaro resistente (Hammarstrom & Hasselgren, 1974; Lilja *et al.*, 1983). Estudos histoquímicos prévios demonstraram que uma isoenzima específica no citoplasma de osteoclastos multinucleados poderia ser distinguida daquelas presentes em outras células ósseas devido sua resistência em ser inibida pelo ácido tartárico. Foi também observado que células semelhantes a osteoclastos e seus precursores coravam-se positivamente para Fosfatase Ácida Tartrato Resistente (TRAP) (Minkin, 1982; Chappard *et al.*, 1983; Van De Wijngaert & Burger, 1986; Cole & Walters, 1987; Andersson & Marks, 1989). Portanto, a imunomarcagem com TRAP pode ser usada para identificação de células envolvidas na movimentação dentária ortodôntica, visto que este envolve um processo inflamatório que leva à reabsorção óssea (Lilja *et al.*, 1983; Farrell *et al.*, 1990, 1991).

Os resultados deste estudo mostraram que os animais submetidos a MDI por 4 dias apresentaram imunomarcagem positiva para TRAP quando comparado aos animais normais, corroborando outros achados prévios de que a MDI induz ativação de osteoclastos e reabsorção óssea (Brudvik & Rygh, 1993; Oshiro *et al.*, 2002; Nakano *et al.*, 2010). O tratamento com Dipirona, nas diversas doses, não foi capaz de impedir tal imunomarcagem. Não existe na literatura estudos que avaliem a imunomarcagem de TRAP na MDI após o tratamento com Paracetamol ou Dipirona. Entretanto, este achado corrobora os dados prévios deste estudo, confirmando que nem o Paracetamol, nem a Dipirona interferem na ativação de osteoclastos e, conseqüentemente, na movimentação dentária induzida por dispositivo ortodôntico.

A FAO é considerada um marcador de atividade osteoblástica (Rodan, 1991; Christenson, 1997; Kuru *et al.*, 1999), essencial para deposição óssea (Christenson, 1997), pois hidrolisa o pirofosfato inorgânico, potente inibidor do processo de mineralização (Coleman, 1992). Neste estudo, os níveis de Fosfatase Alcalina Óssea se mostraram reduzidos em todos os grupos experimentais após a MDI.

Durante a movimentação ortodôntica, em modelos utilizando roedores, há, precocemente, um aumento de eventos reabsortivos a partir do 3º ao 5º dia,

associados a alterações nos níveis de fosfatases. Através de técnicas histoquímicas e bioquímicas, investigadores relataram aumento da atividade de fosfatase ácida (Storey, 1972) e redução da atividade de fosfatase alcalina (Rygh, 1972, 1976; King *et al.*, 1991), especialmente no lado de pressão (Lilja *et al.*, 1984; Engström *et al.*, 1988).

De fato, nossos achados são confirmados por outros estudos, os quais mostram que após a movimentação ortodôntica há redução dos níveis séricos de FAO (Keeling *et al.*, 1993; King & Keeling, 1995; Perinetti *et al.*, 2002; Milne *et al.*, 2009) até o 5º dia, seguido de aumentos significantes apenas nos dias 7 e 14 após a movimentação (Keeling *et al.*, 1993). Esta redução dos níveis de FAO pode acontecer devido à alta atividade de fosfatase ácida, que tem sido observada nas etapas iniciais de movimentação dental, enquanto que os altos níveis de FAO são descritos após 7 dias, quando se inicia a deposição óssea (Keeling *et al.*, 1993). Portanto, com base nesses achados, podemos confirmar que o Paracetamol não afeta a movimentação ortodôntica, bem como sugerir que a Dipirona Sódica age de maneira semelhante.

Quanto aos parâmetros sistêmicos, avaliando o estudo hematológico, foi possível observar que a MDI alterou tanto a contagem total quanto a diferencial dos leucócitos de sangue periférico dos animais. Tal alteração caracterizou-se por uma leucocitose no 4º dia, marcada por neutrofilia ($p < 0,05$) nos grupos Salina e Paracetamol. O tratamento com Dipirona, por sua vez, foi capaz de prevenir a neutrofilia observada no 4º dia após a MDI.

Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa em resposta a uma agressão (Zhang *et al.*, 2004). Portanto, o trauma cirúrgico, decorrente da instalação do dispositivo, associado à aplicação da força ortodôntica pode explicar o aumento do número de neutrófilos no grupo Salina. Alguns estudos corroboram estes achados. Melhem *et al.* (1993) concluíram que durante a resposta local do hospedeiro, há aumento de fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF). A injeção de GM-CSF aumentou a produção de neutrófilos a partir da medula óssea causando neutrofilia periférica em ratos (Ulich *et al.*, 1991). O grupo tratado com Paracetamol, também apresentou neutrofilia semelhante ao grupo Salina, confirmando os achados de Mamuk & Melli (2007), os quais demonstraram que, o paracetamol não foi capaz de alterar a contagem de PMNs após administração de zymozan, um agente pró-inflamatório, na articulação de ratos.

O tratamento com Dipirona, nas diversas doses, preveniu de forma significativa a neutrofilia observada nos grupos Salina e Paracetamol ao final do experimento, mantendo normal o nível de neutrófilos circulante após 4 dias de MDI. Muitos estudos têm mostrado que o uso de pirazolônicos, especialmente da Dipirona, tem sido seguido por redução no número de neutrófilos circulantes (agranulocitose) (Bentur, & Cohen, 2004; Uetrecht *et al.*, 1995; Ibáñez *et al.*, 2005). Devido ao risco de agranulocitose, as pirazonas têm sido banidas ou retiradas do mercado de vários países. No entanto, estes fármacos ainda estão disponíveis em alguns países da Europa, tais como Alemanha, França, Espanha e Portugal (Hedenmalm, & Spigset, 2002), bem como na África, Américas Latina e do Sul, onde inclui-se o Brasil. Todavia, o risco absoluto de agranulocitose associada ao uso de pirazolônicos em doses terapêuticas ou por curto período de tempo tem sido considerado muito baixo (Ibáñez *et al.*, 2005).

Em relação ao número de mononucleares circulantes observou-se uma tendência, apesar de não haver significância estatística, ao aumento destas células em todos os grupos. Existem diversos trabalhos relacionando um aumento do número, como também do recrutamento, de células mononucleares fagocíticas logo após a fase inicial da MDI (Jäger *et al.*, 1993; Vandevska-Radunovic *et al.*, 1997, 1999) devido ao influxo aumentado de monócitos provenientes do sangue (Nakamura *et al.*, 2001). Estas células sanguíneas, que participam do processo de remodelação do osso alveolar e ligamento periodontal, quando saem da corrente sanguínea passam a se chamar de macrófagos. Estes, promovem a fagocitose do exsudato, dos restos protéicos e celulares e em especial da matriz extracelular hialinizada, que se estabelecem na região do ligamento periodontal durante a MDI (Brudvik & Rygh, 1993b; Hellsing & Hammarstrom, 1996; Consolaro, 2007). Entretanto, o aumento significativo de mononucleares somente deve ocorrer por volta do sétimo dia de experimento, após a completa formação das áreas hialínicas (Vandevska-Radunovic *et al.*, 1997).

Considerando que o Paracetamol pode afetar a função hepática, buscou-se avaliar os níveis séricos de TGO e TGP. A transaminase glutâmico oxalacética (TGO), também chamada de aspartato aminotransferase (AST), é encontrada no citosol e na mitocôndria de hepatócitos (Herlong 1994), porém altos níveis teciduais são também encontrados no músculo esquelético, rim, cérebro e pâncreas (Rej, 1989). Cerca de 60-70% da atividade de AST em hepatócitos humanos está

localizada dentro da mitocôndria (Schmidt & Schmidt, 1990). Portanto, quando encontrado no sangue, TGO é considerada um indicador sensível de dano mitocondrial, especialmente em regiões centrilobulares hepáticas, as quais são sensíveis a injúria hepática hipóxica e tóxica (Schmidt & Schmidt, 1990; Amancher, 1998). No entanto, sabendo que problemas cardíacos e músculo-esqueléticos podem estar relacionados à elevação de TGO, é interessante também avaliar os níveis séricos de TGP para determinação de toxicidade, por esta apresentar menos resultados falso-negativos (Ozer *et al.*, 2008)

A transaminase glutâmico pirúvica (TGP), também conhecida por alanina aminotransferase (ALT), é uma enzima hepática amplamente distribuída no organismo. As isoenzimas TGP humanas são encontradas no citosol e mitocôndrias do fígado, rim e músculos esqueléticos e cardíacos (Sakagishi, 1995). Entretanto, a maior concentração de TGP encontra-se no citosol de células do parênquima hepático (Sherman, 1991), e portanto os níveis séricos de TGP têm sido considerados o marcador bioquímico padrão-ouro para danos hepáticos (Amancher, 1998; Ozer *et al.*, 2008).

TGP e TGO agem catalisando a transferência de um grupo amino da alanina ou aspartato, respectivamente, à α -ketoglutarato, para produzir glutamato e piruvato ou oxalacetato, respectivamente. Porém quando os hepatócitos estão danificados, estes liberam seus conteúdos, incluindo TGP e TGO, no espaço extracelular. Então, as enzimas liberadas entram na circulação e assim, observa-se o aumento dos níveis séricos de TGP e TGO, quando comparado a indivíduos saudáveis (Ozer *et al.*, 2008).

Nesse estudo, os níveis séricos de TGO e TGP dos animais submetidos a MDI não sofreram alteração. O mesmo foi observado quando do tratamento prévio dos ratos com Paracetamol e Dipirona Sódica com MDI.

Estudos têm mostrado que o uso de Paracetamol, por longos períodos e/ou em altas doses, pode influenciar os níveis de transaminases, especialmente TGP (Sherman, 1991; Fry & Seeff, 1995). Relatos prévios mostraram que o dano hepático induzido por paracetamol é causa de 54% e 16% dos casos de falha hepática aguda no Reino Unido e Estados Unidos, respectivamente (O'Grady, 1997).

O paracetamol, também conhecido por N-acetil-p-aminofenol, é quase completamente absorvido pelo trato gastrointestinal, e em doses terapêuticas é

metabolizado em metabólitos não-tóxicos, por conjugação, no fígado (Toes *et al.*, 2005). Espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) estão envolvidas, de forma importante no desenvolvimento da hepatotoxicidade induzida por PAR (Michael *et al.*, 1999; Knight *et al.*, 2001). Durante um evento de overdose, as vias normais de conjugação do metabolismo se tornam saturadas e PAR é metabolizado oxidativamente no fígado via sistema P450 oxidase em metabólitos reativos e tóxicos, como a N-acetil-p-benzoquinona-imina (NAPQI). NAPQI é rapidamente conjugada com a glutathiona, um doador sulfidril. Em casos de excesso de NAPQI, ou redução do estoque de glutathiona, NAPQI interage com proteínas celulares vitais e com a bicamada lipídica das membranas dos hepatócitos, resultando em morte celular e necrose hepática centrilobular (O'Grady, 1997; Dargan & Jones, 2003), promovendo, assim, liberação de transaminases para a circulação.

Entretanto, o Paracetamol tem se mostrado seguro quando utilizado sob doses terapêuticas. (Prescott, 1980; Mazer & Perrone, 2008; Zira *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2010). Foi definido, após ingestão aguda e única de PAR, que a dose tóxica de referência é de 150 mg/kg de peso em adultos (Murray *et al.*, 2008), embora tenha sido mostrado que doses de 285 e 348 mg/kg não tenham relação com eventos de injúria hepática (Mahadevan *et al.*, 2006). Assim, estes dados da literatura confirmam os resultados desse estudo.

A Dipirona Sódica parece não estar relacionada à injúria hepática. De acordo com Ackerman *et al.* (1989) que avaliaram 118 adultos jovens, verificou-se que apenas 15% dos pacientes apresentaram alteração de enzimas hepáticas (TGO e TGP) após uso de Dipirona. Sánchez *et al.* (2002), analisando a tolerabilidade gastrointestinal de Dipirona em tratamento subcrônico em ratos, não detectaram alteração de TGO, porém foi observado aumento significativo dos níveis séricos de TGP, porém não estando relacionado à injúria hepática. Os autores consideram a hepatite induzida por metamizol, um metabolito da Dipirona, uma complicação excessivamente rara (Samarasinghe, 1994).

Finalmente, avaliando variação de massa corpórea dos animais observou-se, em todos os grupos experimentais, redução, não significativa, da massa corpórea até o 2º dia de experimento, seguida de tendência ao ganho de peso sem alcançar, no entanto, a curva de peso dos animais normais. Uma possível explicação para

esta perda de peso inicial deve-se provavelmente ao trauma cirúrgico de adaptação dos animais ao dispositivo ortodôntico (Sánchez *et al.*, 2002).

6. CONCLUSÃO

- A dipirona não afetou a resposta inflamatória e a reabsorção óssea alveolar avaliadas através de análises: histologia semi-quantitativa, histomorfometria, marcação imunohistoquímica para TRAP, bem como dosagens de atividade de MPO e de FAO em ratos submetidos à MDI.
- O tratamento com a dipirona mostrou-se seguro, pois não causou neutropenia, alterações significantes hepatócitos, e não afetou significativamente a massa corporal, quando comparada a animais controle.
- Sugere-se que a dipirona possa ser uma importante ferramenta farmacológica quando da ativação ortodôntica sem afetar a movimentação dentária, podendo ser estudada em estudos clínicos prospectivos.

7. REFERÊNCIAS

ABBOTT, F.V.; HELLEMANS, K.G. Phenacetin, acetaminophen and dipyron: analgesic and rewarding effects. **Behav. Brain. Res.**, v. 112, n. 1-2, p. 177-186, Jul. 2000.

ACKERMAN, Z.; FLUGELMAN, M.Y.; WAX, Y.; SHOUVAL, D.; LEVY, M. Hepatitis during measles in young adults: possible role of antipyretic drugs. **Hepatology.**, v. 10, n. 2, p. 203-206, Aug. 1989.

AKIN, E.; GURTON, A.U.; OLMEZ, H. Effects of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. **Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop.**, v. 126, n. 5, p. 608-614, Nov. 2004.

ALVES, D.; DUARTE, I. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyron. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 444, n. 1-2, p. 47-52, May. 2002.

AMACHER, D.E. Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the administration of drugs. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v.27, n. 2, p. 119-130, Apr. 1998.

ANDERSON, G.N.; MARKS, S.C.Jr. Tartrate-resistant acid ATPase as a cytochemical marker for osteoclast. **J. Histochemistry and Cytochemistry.**, v. 37, p. 115-117. 1989.

ANDRADE I. Jr.; SILVA, T.A.; SILVA, G.A.; TEIXEIRA, A.L.; TEIXEIRA, M.M. The role of tumor necrosis factor receptor type 1 in orthodontic tooth movement. **J. Dent. Res.**, v. 86, n. 11, p. 1089-1094, Nov. 2007.

APAJALAHTI. S.; SORSA, T.; RAILAVO, S.; INGMAN, T. The in vivo levels of matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during initial orthodontic tooth movement. **J. Dent. Res.**, v. 82, n. 12, p. 1018-1022, Dec. 2003.

ARIAS, O.R.; MARQUEZ-OROZCO, M.C. Aspirin, acetaminophen, and ibuprofen: their effects on orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v. 130, n. 3, p. 364-370, Sep. 2006.

AYOUB, S.S.; COLVILLE-NASH, P.R.; WILLOUGHBY, D.A.; BOTTING, R.M. The involvement of a cyclooxygenase 1 gene-derived protein in the antinociceptive action of paracetamol in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 538, n. 1-3, p. 57-65, May. 2006.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 16, n. 1, p. 42-47, Feb. 2004.

BARTZELA, T.; TÜRP, J.C.; MOTSCHALL, E.; MALTHA, J.C. Medication effects on the rate of orthodontic tooth movement: a systematic literature review. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v. 135, n. 1, p. 16-26, Jan. 2009.

BATRA, P.; KHARBANDA, O.; DUGGAL, R.; SINGH, N.; PARKASH, H. Alkaline phosphatase activity in gingival crevicular fluid during canine retraction. **Orthod. Craniofac. Res.**, v. 9, n. 1, p. 44-51, Feb. 2006.

BATU, O.S.; EROL, K. The effects of some nonsteroidal anti-inflammatory drugs on experimental induced gastric ulcers in rats. **Inflammopharmacology.**, v. 15, n. 6, p.260-5, Dec. 2007.

BENTUR, Y.; COHEN, O. Dipyron overdose. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v. 42, n. 3, p. 261-265. 2004.

BERENGUER, B.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; MOTILVA, V.; LA CASA, C.; HERRERIAS, J.M.; POZO, D.; CALERO, M.J. Effects of celecoxib on acid-challenged gastric mucosa of rats: comparison with metamizol and piroxicam. **Dig. Dis. Sci.**, v. 49, n. 6, p. 937-947, Jun. 2004.

BERTOLINI, A.; FERRARI, A.; OTTANI, A.; GUERZONI, S.; TACCHI, R.; LEONE, S. Paracetamol: new vistas of an old drug. **CNS Drug Rev.**, v. 12, n. 3-4, p. 250-275, Fall-Winter. 2006.

BIANCHI, M.; PANERAI, A.E. The dose-related effects of paracetamol on hyperalgesia and nociception in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 117, n. 1, p. 130-132, Jan. 1996.

BLETSA, A.; BERGGREEN, E.; BRUDVIK, P. Interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha expression during the early phases of orthodontic tooth movement in rats. **Eur. J. Oral Sci.**, v.114, n. 5, p. 423-429, Oct. 2006.

BOTTING, R.M. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? **Clin Infect Dis.**, v. 31 Suppl 5, p. 202-210, Oct. 2000

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.**, v. 78, n. 3, p. 206-209, Mar. 1982.

BRUDVIK, P.; RYGH, P. Root resorption after local injection of prostaglandin E₂ during experimental tooth movement. **Eur. J. Orthod.**, v. 13, n. 4, p. 255-263, Aug. 1991.

BRUDVIK, P.; RYGH, P. The initial phase of orthodontic root resorption incident to local compression of the periodontal ligament. **Eur. J. Orthod.**, v. 15, n. 4, p. 249-263, Aug. 1993a.

BRUDVIK, P.; RYGH, P. Non-clast cells start orthodontic root resorption in the periphery of hyalinized zones. **Eur. J. Orthod.**, v. 15, n. 6, p. 467-480, Dec. 1993b.

BRUDVIK, P.; RYGH, P. Root resorption beneath the main hyalinized zone. **Eur J. Orthod.**, v. 16, n. 4, p. 249-263, Aug. 1994a.

BRUDVIK, P.; RYGH, P. Multi-nucleated cells remove the main hyalinized tissue and start resorption of adjacent root surfaces. **Eur. J. Orthod.**, v. 16, n. 4, p. 265-273, Aug. 1994b.

BRUDVIK, P.; RYGH, P. The repair of orthodontic root resorption: an ultrastructural study. **Eur. J. Orthod.**, v. 17, n. 3, p. 189-198, Jun. 1995.

BUJALSKA, M. Effect of nonselective and selective opioid receptors antagonists on antinociceptive action of acetaminophen [part III]. **Pol. J. Pharmacol.**, v. 56, n. 5, p. 539-545, Sep-Oct. 2004.

BURGER, E.H.; KLEIN-NULEND, J. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. **FASEB J.**, v. 13, p. S101-S112. 1999.

BURKE, J.C.; EVANS, C.A.; CROSBY, T.R.; MEDNIEKS, M.I. Expression of secretory proteins in oral fluid after orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v. 121, n. 3, p. 310-315, Mar. 2002.

CAMPBELL, V.C.; WELCH, S.P. The role of minoxidil on endogenous opioid peptides in the spinal cord: a putative co-agonist relationship between K-ATP openers and opioids. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 417, n. 1-2, p. 91-98, Apr. 2001.

CAO, C.F.; SMITH, Q.T. Crevicular fluid myeloperoxidase at healthy, gingivitis and periodontitis sites. **J. Clin. Periodontol.**, v. 16, n. 1, p. 17-20, Jan. 1989.

CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; ROOS, K.L.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 99, n. 21, p. 13926-13931, Oct. 2002.

CHAPPARD, D.; ALEXANDRA, C.; RIFTAT, G. Histochemical identification of osteoclasts: Review of current methods and reappraisal of a simple procedure for routine diagnosis on undecalcified human iliac bone biopsies. **Basic Applied Histochemistry.**, v. 27, p. 75-85. 1983.

CHRISTENSON, R.H. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. **Clin. Biochem.**, v. 30, n. 8, p. 573-593, Dec. 1997.

COHEN, O.; ZYLBER-KATZ, E.; CARACO, Y.; GRANIT, L.; LEVY, M. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of dipyron metabolites after a single oral dose of dipyron. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 54, n. 7, p. 549-553, Sep. 1998.

COLE, A.; WALTERS, L. M. Tartrate-resistant acid phosphatase in bone and cartilage following decalcification and cold-embedding in plastic. **J. Histochemistry and Cytochemistry.**, v. 35, p. 203-206. 1987.

COLEMAN, J.E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 21, p. 441-83. 1992.

CONSOLARO, A. Tensão nas áreas de compressão do ligamento periodontal durante o movimento ortodôntico. E os binômios? **Rev. Clin. Ortodon. Dental Press.**, v.6, p. 107-110. 2007.

COSTA, D.; MARQUES, A.P.; REIS, R.L.; LIMA, J.L.; FERNANDES, E. Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivatives. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 40, n. 4, p. 632-640, Feb. 2006.

DARGAN, P.; JONES A.; Management of paracetamol poisoning. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 24, n. 4, p. 154-157, Apr. 2003.

DAVIDOVITCH, M.; TIROSH, E.; TAL, Y. The relationship between joint hypermobility and neurodevelopmental attributes in elementary school children. **J. Child. Neurol.**, v. 9, n. 4, p. 417-419, Oct. 1994.

DOGRUL, A.; GÜLMEZ, S.E.; DEVECI, M.S.; GUL, H.; OSSIPOV, M.H.; PORRECA, F.; TULUNAY, F.C. The local antinociceptive actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs in the mouse radiant heat tail-flick test. **Anesth. Analg.**, v. 104, n. 4, p. 927-935, Apr. 2007.

DUARTE, I.D.; dos SANTOS, I.R.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 217, n. 2-3, p. 225-227, Jul. 1992.

ENGSTRÖM, C.; GRANSTRÖM, G.; THILANDER, B. Effect of orthodontic force on periodontal tissue metabolism. A histologic and biochemical study in normal and hypocalcemic young rats. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v. 93, n. 6, p. 486-495, Jun. 1988.

FAN, X.; ROY, E.; ZHU, L.; MURPHY, T.C.; ACKERT-BICKNELL, C.; HART, C.M.; ROSEN, C.; NANES, M.S.; RUBIN, J. Nitric oxide regulates receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 751-759, Feb. 2004.

FARRELL, L.; YEN, E.H.K.; BRUDVIK, P.; RYGH, P.; SUGA, D.M. Identification of orthodontically induced root resorptive cells using TRAP stain. **J. Dent. Res.**, v. 69, p. 201. 1990.

FARRELL, L.; YEN, E.H.K.; BRUDVIK, P.; RYGH, P.; SUGA, D.M. Response of orthodontically induced periodontal resorptive cells to PGE1 *in vitro*. **J. Dent. Res.**, v. 70, p. 336. 1991.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M. III - Prostaglandin hyperalgesia: relevance of the peripheral effect for the analgesic action of opioid-antagonists. **Prostaglandins**, v. 18, n. 2, p. 201-208, Aug. 1979.

FRACALOSSO, A. C. **Análise da movimentação dentária induzida em ratos: influência do alendronato nas reabsorções dentárias, estudo comparativo em cortes transversais e longitudinais e avaliação microscópica em diferentes períodos de observação.** 2007. 171f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2007.

FRACALOSSO, A.C.C.; SANTAMARIA Jr, M.; CONSOLARO, M.F.; CONSOLARO, 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, Jan. 2009.

FRY, S.W.; SEEFF, L.B. Hepatotoxicity of analgesics and anti-inflammatory agents. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v. 24, n. 4, p. 875-905, Dec. 1995.

GAMEIRO, G.H.; PEREIRA-NETO, J.S.; MAGNANI, M.B.; NOUER, D.F. The influence of drugs and systemic factors on orthodontic tooth movement. **Clin. Orthod.**, v. 41, n. 2, p. 73-78, Feb. 2007.

GAMEIRO, G.H.; NOUER, D.F.; PEREIRA-NETO, J.S.; de ARAÚJO MAGNANI, M.B.; de ANDRADE, E.D.; NOVAES, P.D.; de ARRUDA VEIGA, M.C. Histological analysis of orthodontic root resorption in rats treated with the cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor celecoxib. **Orthod. Craniofac. Res.**, v. 11, n. 3, p. 156-161, Aug. 2008.

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

GARLET, T.P.; COELHO, U.; REPEKE, C.E.; SILVA, J.S.; CUNHA F. de Q.; GARLET, G.P. Differential expression of osteoblast and osteoclast chemoattractants in compression and tension sides during orthodontic movement. **Cytokine.**, v. 42, n. 3, p. 330-335, Jun. 2008.

GENÇ, O.; TURGUT, S.; TURGUT, G.; KORTUNAY, S. Inhibition of spinal reflexes by acetylsalicylate and metamizol (dipyrone) in rats. **Pharmacology.**, v. 69, n. 3, p. 123-126, Nov. 2003.

GENÇ, E.; AVUNDUK, M.C.; GENÇ, B.O.; SAHIN, A.S.; OZ, M. The effects of chronic administration of sumatriptan and dipyrone on serotonergic system in the rat brain: an immunohistochemical study. **Acta Neurol. Scand.**, v. 120, n. 4, p. 264-269, Oct. 2009.

GIANNOPOULOU, C.; MOMBELLI, A.; TSINIDOU, K.; VASDEKIS, V.; KAMMA, J. Detection of gingival crevicular fluid cytokines in children and adolescents with and without fixed orthodontic appliances. **Acta. Odontol. Scand.**, v. 66, n. 3, p. 169-173, Jun. 2008.

GONZALES, C.; HOTOKEZAKA, H.; ARAI, Y.; NINOMIYA, T.; TOMINAGA, J.; JANG, I.; HOTOKEZAKA, Y.; TANAKA, M.; YOSHIDA, N. An in vivo 3D micro-CT evaluation of tooth movement after the application of different force magnitudes in rat molar. **Angle Orthod.**, v. 79, n. 4, p. 703-714, Jul. 2009.

GRAHAM, G.G.; SCOTT, K.F. Mechanisms of action of paracetamol and related analgesics. **Inflammopharmacology.**, v. 11, n. 4, p. 401-413. 2003.

GRANADOS-SOTO, V.; LÓPEZ-MUÑOZ, F.J.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G.; SALAZAR, L.A.; VILLARREAL, J.E.; FLORES-MURRIETA, F.J. Characterization of the analgesic effect of paracetamol and caffeine combinations in the pain-induced functional impairment model in the rat. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 45, n. 7, p. 627-631, Jul. 1993.

GRUNDMANN, U.; WÖRNLE, C.; BIEDLER, A.; KREUER, S.; WROBEL, M.; WILHELM, W. The efficacy of the non-opioid analgesics parecoxib, paracetamol and metamizol for postoperative pain relief after lumbar microdiscectomy. **Anesth. Analg.**, v. 103, n. 1, p. 217-222, Jul. 2006.

HAMAYA, M.; MIZOGUCHI, I.; SAKAKURA, Y.; YAJIMA, T.; ABIKO, Y. Cell death of osteocytes occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. **Calcif. Tissue Int.**, v. 70, n. 2, p. 117-126, Feb. 2002.

HAMMARSTRÖM, L.E.; HASSELGREN, G. Acid phosphatase in developing teeth and bone of man and Macaque monkey. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 82, n. 5, p. 381-395. 1974.

HECKER, M.; MÜLSCH, A.; BASSENGE, E.; BUSSE, R. Vasoconstriction and increased flow: two principal mechanisms of shear stress-dependent endothelial autacid release. **Am. J. Physiol.**, v. 265, n. 3 Pt 2, p. H828-833, Sep. 1993.

HEDENMALM, K.; SPIGSET, O. Agranulocytosis and other blood dyscrasias associated with dipyron (metamizole). **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 58, n. 4, p. 265-274, Jul. 2002.

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

HELLSING, E.; HAMMARSTROM, L. The hyaline zone and associated root surface changes in experimental orthodontics in rats: a light and scanning electron microscope study. **Eur. J. Orthod.**, v.18, n. 1, p. 11-18, Feb. 1996.

HERLONG, H.F. Approach to the patient with abnormal liver enzymes. **Hosp. Pract. (Off Ed)**, v. 29, n. 11, p. 32-38, Nov. 1994.

HERNÁNDEZ-DELGADILLO, G.P.; LÓPEZ-MUÑOZ, F.J.; SALAZAR, L.A.; CRUZ, S. L. Morphine and dipyrrone co-administration delays tolerance development and potentiates antinociception. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 469, n. 1-3, p. 71-79, May. 2003.

HERNÁNDEZ-DELGADILLO, G.P.; CRUZ, S.L. Dipyrrone potentiates morphine-induced antinociception in dipyrrone-treated and morphine-tolerant rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 502, n. 1-2, p. 67-73, Oct. 2004.

HERNÁNDEZ-DELGADILLO, G.P.; CRUZ, S.L. Endogenous opioids are involved in morphine and dipyrrone analgesic potentiation in the tail flick test in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 546, n. 1-3, p. 54-59, Sep. 2006.

IBÁÑEZ, L.; VIDAL, X.; BALLARÍN, E.; LAPORTE, J.R. Agranulocytosis associated with dipyrrone (metamizol). **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 60, n. 11, p. 821-829, Jan. 2005.

IGARASHI, K.; MITANI, H.; ADACHI, H.; SHINODA, H. Anchorage and retentive effects of a bisphosphonate (AHBuBP) on tooth movements in rats. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v. 106, n. 3, p. 279-289, Sep. 1994.

IGARASHI, K.; ADACHI, H.; MITANI, H.; SHINODA, H. Inhibitory effect of the topical administration of a bisphosphonate (risedronate) on root resorption incident to orthodontic tooth movement in rats. **J. Dent. Res.**, v. 75, n. 9, p. 1644-1649, Sep. 1996.

INGMAN, T.; APAJALAHTI, S.; MÄNTYLÄ, P.; SAVOLAINEN, P.; SORSA, T. Matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a pilot study during 1 month of follow-up after fixed appliance activation. **Eur. J. Orthod.**, v. 27, n. 2, p. 202-207, Apr. 2005.

JÄGER, A.; RADLANSKI, R.J.; GÖTZ, W. Demonstration of cells of the mononuclear phagocyte lineage in the periodontium following experimental tooth movement in the rat. An immunohistochemical study using monoclonal antibodies ED1 und ED2 on paraffin-embedded tissues. **Histochemistry.**, v. 100, n. 2, p. 161-166, Aug. 1993.

JÄGER, A.; ZHANG, D.; KAWARIZADEH, A.; TOLBA, R.; BRAUMANN, B.; LOSSDÖRFER, S.; GÖTZ, W. Soluble cytokine receptor treatment in experimental orthodontic tooth movement in the rat. **Eur. J. Orthod.**, v. 27, n. 1, p. 1-11, Feb. 2005.

JONES, O.A.; VOULVOULIS, N.; LESTER, J.N. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. **Water Res.**, v. 36, n. 20, p. 5013-5022, Dec. 2002.

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

KAMPE, S.; WARM, M.; LANDWEHR, S.; DAGTEKIN, O.; HAUSSMANN, S.; PAUL, M.; PILGRAM, B.; KIENCKE, P. Clinical equivalence of IV paracetamol compared to IV dipyrone for postoperative analgesia after surgery for breast cancer. **Curr. Med. Res. Opin.**, v. 22, n.10, p. 1949-1954, Oct. 2006.

KANER, D.; BERNIMOULIN, J.P.; KLEBER, B.M.; HEIZMANN, W.R.; FRIEDMANN, A. Gingival crevicular fluid levels of calprotectin and myeloperoxidase during therapy for generalized aggressive periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 41, n. 2, p. 132-139, Apr. 2006.

KANZAKI, H.; CHIBA, M.; SHIMIZU, Y.; MITANI, H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E₂ synthesis. **J. Bone Miner. Res.**, v. 17, n. 2, p. 210-220, Feb. 2002.

KEELING, S.D.; KING, G.J.; McCOY, E.A.; VALDEZ, M. Serum and alveolar bone phosphatase changes reflect bone turnover during orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v. 103, n. 4, p. 320-326, Apr. 1993.

KEHOE, M.J.; COHEN, S.M.; ZARRINNIA, K.; COWAN, A. The effect of acetaminophen, ibuprofen, and misoprostol on prostaglandin E₂ synthesis and the degree and rate of orthodontic tooth movement. **Angle Orthod.**, v. 66, n. 5, p. 339-349. 1996.

KILIÇ, F.; EROL, K. Central components in the antinociceptive activity of dipyrone in mice. **Inflammopharmacology**, v. 8, n. 3, p. 259–265. 2000.

KING, G.J.; KEELING, S.D.; WRONSKI, T.J. Histomorphometric study of alveolar bone turnover in orthodontic tooth movement. **Bone.**, v. 12, n. 6, p. 401-409. 1991.

KING, G.J.; KEELING, S.D. Orthodontic bone remodeling in relation to appliance decay. **Angle Orthod.**, v. 65, n. 2, p. 129-140. 1995.

KLEIN-NULEND, J.; VAN DER PLAS, A.; SEMEINS, C.M.; AJUBI, N.E.; FRANGOS, J.A.; NIJWEIDE, P.J.; BURGER, E.H. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. **FASEB J.**, v. 9, n. 5, p. 441-445, Mar. 1995.

KNIGHT, T.R.; KURTZ, A.; BAJT, M.L.; HINSON, J.A.; JAESCHKE, H. Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen toxicity: role of mitochondrial oxidant stress. **Toxicol. Sci.**, v. 62, n. 2, p. 212-220, Aug. 2001.

KOHNO, S.; KAKU, M.; TSUTSUI, K.; MOTOKAWA, M.; OHTANI, J.; TENJO, K.; TOHMA, Y.; TOKIMASA, C.; FUJITA, T.; KAWATA, T.; TANNE, K. Expression of vascular endothelial growth factor and the effects on bone remodeling during experimental tooth movement. **J. Dent. Res.**, v.82, n. 3, p. 177-182, Mar. 2003.

KOHNO, T.; MATSUMOTO, Y.; KANNO, Z.; WARITA, H.; SOMA, K. Experimental tooth movement under light orthodontic forces: rates of tooth movement and changes of the periodontium. **J. Orthod.**, v. 29, n. 2, p. 129-135, Jun. 2002.

KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v. 129, n. 4, p. 469, Apr. 2006a..

KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. The effect of drugs on orthodontic tooth movement. **Orthod. Craniofac. Res.**, v. 9, n. 4, p. 163-171, Nov. 2006b.

KRISHNAN, V. Orthodontic pain: from causes to management--a review. **Eur. J. Orthod.**, v. 29; n. 2, p. 170-179, Apr. 2007.

KURU, L.; GRIFFITHS, G.S.; PETRIE, A.; OLSEN, I. Alkaline phosphatase activity is upregulated in regenerating human periodontal cells. **J. Periodontal. Res.**, v. 34, n. 2, p. 123-127, Feb. 1999.

LARA, V.S.; FIGUEIREDO, F.; da SILVA, T.A.; CUNHA, F.Q. Dentin-induced in vivo inflammatory response and in vitro activation of murine macrophages. **J. Dent. Res.**, v. 82, n. 6 p. 460-465, Jun. 2003.

LILJA, E.; LINDSKOG, S.; HAMMARSTRÖM, L. Alkaline phosphatase activity and tetracycline incorporation during initial orthodontic tooth movement in rats. **Acta Odontol. Scand.**, v.42, n. 1, p. 1-11, Feb. 1984.

LILJA, E.; LINDSKOG, S.; HAMMARSTREM, L. Histochemistry of enzymes associated with tissue degeneration incident to orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod.**, v. 83, p. 62-75. 1983.

LIM, A.Y.; SEGARRA, I.; CHAKRAVARTHI, S.; AKRAM, S.; JUDSON, J.P. Histopathology and biochemistry analysis of the interaction between sunitinib and paracetamol in mice. **BMC Pharmacol.**, v. 15, n. 10, p. 14, Oct. 2010.

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

LÓPEZ-MUÑOZ, F.J.; SALAZAR, L.A. Analgesic effects of multiple combinations of morphine and aspirin in the rat. **Proc. West Pharmacol. Soc.**, v. 36, p. 263-266. 1993.

LOPEZ-MUÑOZ, F.J.; VILLALON, C.M.; TERRON, J.A.; SALAZAR, L.A. Analgesic interactions produced by combinations of dipyron and morphine in the rat. **Proc. West Pharmacol. Soc.**, v. 37, p. 17-19. 1994.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.J.; GODÍNEZ-CHAPARRO, B.; HUERTA-CRUZ, J.C.; GUEVARA-LÓPEZ, U.; DOMÍNGUEZ-RAMÍREZ, A.M.; CORTÉS-ARROYO, A.R. The antinociceptive efficacy of morphine, metamizol, or their combination in an experimental rat model with different levels of inflammatory pain. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 91, n. 1, p. 196-201, Nov. 2008.

LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyron-induced spinal and peripheral analgesia. **Inflamm. Res.**, v. 45, n. 6, p. 308-311, Jun. 1996.

LOWNEY, J.J.; NORTON, L.A.; SHAFER, D.M.; ROSSOMANDO, E.F. Orthodontic forces increase tumor necrosis factor alpha in the human gingival sulcus. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v.108, n. 5,p. 519-524, Nov. 1995.

MAHADEVAN, S.B.; McKIERNAN, P.J.; DAVIES, P.; KELLY, D.A. Paracetamol induced hepatotoxicity. **Arch. Dis. Child.**, v. 91, n. 7, p. 598-603, Jul. 2006.

MAMUK, S.; MELLI, M. Effect of aspirin, paracetamol and their nitric oxide donating derivatives on exudate cytokine and PGE₂ production in zymosan-induced air pouch inflammation in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 561, n. 1-3, p. 220-225, Apr. 2007.

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

MARQUEZ, L.A.; DUNFORD, H.B. Interaction of acetaminophen with myeloperoxidase intermediates: optimum stimulation of enzyme activity. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 305, n. 2, p. 414-420, Sep. 1993.

MARTINS-ORTIZ, M.F. **Influência dos bisfosfonatos na movimentação dentária induzida, na frequência e nas dimensões das reabsorções radiculares associadas.** Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2004.

MAZER, M.; PERRONE, J. Acetaminophen-induced nephrotoxicity: pathophysiology, clinical manifestations, and management. **J. Med. Toxicol.**, v. 4, n. 1, p. 2-6, Mar. 2008.

MAZZIEIRO, E.T. **Bisfosfonato e movimentação dentária induzida: avaliação microscópica de seus efeitos.** Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 1999.

MEHLISCH, D.R. The efficacy of combination analgesic therapy in relieving dental pain. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 133, n. 7, p. 861-871, Jul. 2002.

MELHEM, M.F.; MEISLER, A.I.; SAITO, R.; FINLEY, G.G.; HOCKMAN, H.R.; KOSKI, R.A. Cytokines in inflammatory malignant fibrous histiocytoma presenting with leukemoid reaction. **Blood.**, v. 82, n. 7, p. 2038-2044, Oct. 1993.

MICHAEL, S.L.; PUMFORD, N.R.; MAYEUX, P.R.; NIESMAN, M.R.; HINSON, J.A. Pretreatment of mice with macrophage inactivators decreases acetaminophen hepatotoxicity and the formation of reactive oxygen and nitrogen species. **Hepatology.**, v. 30, n. 1, p. 186-195, Jul. 1999.

MILANO, J.; ROSSATO, M.F.; OLIVEIRA, S.M.; DREWES, C.; MACHADO, P.; BECK, P.; ZANATTA, N.; MARTINS, M.A.; MELLO, C.F.; RUBIN, M.A.; FERREIRA, J.; BONACORSO, H.G. Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4, 5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice. **Life Sci.**, v.83, n. 21-22, p. 739-746, Nov. 2008.

MILNE, T.J.; ICHIM, I.; PATEL, B.; McNAUGHTON, A.; MEIKLE, M.C. Induction of osteopenia during experimental tooth movement in the rat: alveolar bone remodelling and the mechanostat theory. **Eur. J. Orthod.**, v. 31, n. 3, p. 221-231, Jun. 2009.

MINKIN, C. Bone acid phosphatase: Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. **Calcined Tissue International.**, v. 34, p. 285-290. 1982.

MIYASAKI, K.T.; NEMIROVSKIY, E. Myeloperoxidase isoform activities released by human neutrophils in response to dental and periodontal bacteria. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 12, n. 1, p. 27-32, Feb. 1997.

MIYOSHI, K.; IGARASHI, K.; SAEKI, S.; SHINODA, H.; MITANI, H. Tooth movement and changes in periodontal tissue in response to orthodontic force in rats vary depending on the time of day the force is applied. **Eur. J. Orthod.**, v. 23, n. 4, p. 329-338, Aug. 2001.

MOHAMMED, A.H.; TATAKIS, D.N.; DZIAK, R. Leukotrienes in orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod.**, v. 95, n. 3, p. 232-237, Mar. 1989.

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

MURRAY, K.F.; HADZIC, N.; WIRTH, S.; BASSETT, M.; KELLY, D. Drug-related hepatotoxicity and acute liver failure. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, v. 47, n, 4, p. 395-405, Oct. 2008.

NAKAMURA, K.; SAHARA, N.; DEGUCHI, T. Temporal changes in the distribution and number of macrophage-lineage cells in the periodontal membrane of the rat molar in response to experimental tooth movement. ***Arch. Oral Biol.***, v. 46, n. 7, p. 593-607, Jul. 2001.

NAKANO, Y.; YAMAGUCHI, M.; FUJITA, S.; ASANO, M.; SAITO, K.; KASAI, K. Expressions of RANKL/RANK and M-CSF/c-fms in root resorption lacunae in rat molar by heavy orthodontic force. ***Eur. J. Orthod.***, v.10, Sep. 2010.

NOSSAMAN, B.D.; BABER, S.R.; NAZIM, M.M.; WALDRON, P.R.; HYMAN, A.L.; KADOWITZ, P.J. Acetaminophen, phenacetin and dipyron do not modulate pressor responses to arachidonic Acid or to pressor agents. ***Pharmacology.***, v. 80, n, 4, p. 249-260. 2007.

O'GRADY, J.G. Paracetamol hepatotoxicity: how to prevent. ***J. R. Soc. Med.***, v. 90, n. 7, p. 368-370, Jul. 1997.

OHKAWA, S. Effects of orthodontic forces and anti-inflammatory drugs on the mechanical strength of the periodontium in the rat mandibular first molar. ***Am. J. Orthod.***, v. 81, n. 6, p. 498-502, Jun. 1982.

ONKOL, T.; SAHIN, M.F.; YILDIRIM, E.; EROL, K.; ITO, S. Synthesis and antinociceptive activity of (5-chloro-2(3H)-benzoxazolone-3-yl) propanamide derivatives. ***Arch. Pharm. Res.***, v. 27, n. 11, p. 1086-1092, Nov. 2004.

OSHIRO, T.; SHIOTANI, A.; SHIBASAKI, Y.; SASAKI, T. Osteoclast induction in periodontal tissue during experimental movement of incisors in osteoprotegerin-deficient mice. ***Anat Rec.***, v. 266, n. 4, p. 218-225, Apr. 2002.

OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. ***Toxicology.***, v. 245, n. 3, p. 194-205, Mar. 2008.

PEREIRA, A.C. **Influência da gravidez e dos anticoncepcionais na reabsorção radicular e na remodelação óssea, conseqüente à movimentação dentária induzida: avaliação microscópica.** 1995. 141 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1995.

PERINETTI, G.; PAOLANTONIO, M.; D'ATTILIO, M.; D'ARCHIVIO, D.; TRIPODI, D.; FEMMINELLA, B.; FESTA, F.; SPOTO, G. Alkaline phosphatase activity in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v. 122, n. 5, p. 548-556, Nov. 2002.

PERINETTI, G.; SERRA, E.; PAOLANTONIO, M.; BRUÈ, C.; MEO, S.D.; FILIPPI, M.R.; FESTA, F.; SPOTO, G. Lactate dehydrogenase activity in human gingival crevicular fluid during orthodontic treatment: a controlled, short-term longitudinal study. **J. Periodontol.**, v. 76, n. 3, p. 411-417, Mar. 2005.

PIERRE, S.C.; SCHMIDT, R.; BRENNEIS, C.; MICHAELIS, M.; GEISLINGER, G.; SCHOLICH, K. Inhibition of cyclooxygenases by dipyrrone. **Br. J. Pharmacol.**, v.151, n. 4, p. 494-503, Jun. 2007.

PRESCOTT, L.F. Hepatotoxicity of mild analgesics. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 10, n. 2, p. 373S-379S, Oct. 1980.

PROFFIT, W.R.; FIELDS, H.W. 2000. Contemporary orthodontics. Mosby St. Louis.

QUINN, M.T.; GAUSS, K.A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. **J. Leukoc. Biol.**, v. 76, n. 4, p. 760-781, Oct. 2004.

RAO, P.; KNAUS, E.E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 11, n. 2, p. 81s-110s, Sep. 2008.

REITAN, K.; KVAM, E. Comparative behavior of human and animal tissue during experimental tooth movement. **Angle Orthod.**, v. 41, n. 1, p. 1-14, Jan. 1971.

REJ, R. Aminotransferases in disease. **Clin. Lab. Med.**, v. 9, n. 4, p. 667-687, Dec. 1989.

REN, Y.; VISSINK, A. Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 116, n. 2, p. 89-97, Apr. 2008.

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

REZENDE, R.M.; FRANÇA, D.S.; MENEZES, G.B.; dos REIS, W.G.; BAKHLE, Y.S.; FRANCISCHI, J.N. Different mechanisms underlie the analgesic actions of paracetamol and dipyron in a rat model of inflammatory pain. **Br. J. Pharmacol.**, v. 153, n. 4, p. 760-768, Feb. 2008.

ROCHE, J.J.; CISNEROS, G.J.; ACS, G. The effect of acetaminophen on tooth movement in rabbits. **Angle Orthod.**, v. 67, n. 3, p. 231-236. 1997.

RODAN, S.B.; WESOLOWSKI, G.; THOMAS, K.A.; YOON, K.; RODAN, G.A. Effects of acidic and basic fibroblast growth factors on osteoblastic cells. **Connect Tissue Res.**, v. 20, n. 1-4, p. 283-288. 1989.

RODAN, G.A. Mechanical loading, estrogen deficiency, and the coupling of bone formation to bone resorption. **J. Bone Miner. Res.**, v. 6, n. 6, p. 527-530, Jun. 1991.

RYGH, P. Ultrastructural cellular reactions in pressure zones of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. **Acta Odontol. Scand.**, v. 30, n. 5, p. 575-593, Nov. 1972.

RYGH, P. Ultrastructural changes in pressure zones of human periodontium incident to orthodontic tooth movement. **Acta Odontol. Scand.**, v. 31, n. 2, p. 109-122. 1973.

RYGH, P. Hyalinization of the periodontal ligament incident to orthodontic tooth movement. **Nor. Tannlaegeforen. Tid.** v. 84, n. 9, p. 352-357, Oct. 1974a.

RYGH, P. Elimination of hyalinized periodontal tissues associated with orthodontic tooth movement. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 82, n. 1, p. 57-73. 1974b.

RYGH, P.; BOWLING, K.; HOVLANDSDAL, L.; WILLIAMS, S. Activation of the vascular system: a main mediator of periodontal fiber remodeling in orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod.**, v. 89, n. 6, p. 453-468, Jun. 1986.

RYGH, P. Ultrastructural changes in tension zones of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod.**, v. 70, n. 3, 269-281, Sep. 1976

RYGH, P. Orthodontic root resorption studied by electron microscopy. **Angle Orthod.**, v. 47, n. 1, p. 1-16, Jan. 1977 .

SACHS, C.J. Oral analgesics for acute nonspecific pain. **Am. Fam. Physician**, v. 71, n. 5, p. 913-918, Mar. 2005.

SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 101, n. 10, p. 3680-3685. Mar. 2004.

SAKAGISHI, Y. Alanine aminotransferase (ALT). **Nippon Rinsho.**, v. 53, n. 5, p. 1146-1150. May. 1995.

SALMASSIAN, R.; OESTERLE, L.J.; SHELLHART, W.C.; NEWMAN, S.M. Comparison of the efficacy of ibuprofen and acetaminophen in controlling pain after orthodontic tooth movement. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v. 135, n. 4, p. 516-521. Apr. 2009.

SAMARASINGHE, D. Alcohol policies--in poverty and in wealth. **Addiction.**, v. 89, n. 6, p. 643-646. Jun. 1994.

SÁNCHEZ, S.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; ORTIZ, P.; MOTILVA, V.; MARTÍN, M.J. Gastrointestinal tolerability of metamizol, acetaminophen, and diclofenac in subchronic treatment in rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 47, n. 12, p. 2791-2798. Dec. 2002.

SAUZEM, P.D.; SANT'ANNA, G. da S.; MACHADO, P.; DUARTE, M.M.; FERREIRA, J.; MELLO, C.F.; BECK, P.; BONACORSO, H.G.; ZANATTA, N.; MARTINS, M.A.; RUBIN, M.A. Effect of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles on chronic inflammatory pain model in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 616, n. 1-3, p. 91-100. Aug. 2009.

SCHMIDT, E.; SCHMIDT, F.W. Progress in the enzyme diagnosis of liver disease: reality or illusion? **Clin. Biochem.**, v. 23, n. 5, p. 375-382, Oct. 1990.

SEIFI, M.; ESLAMI, B.; SAFFAR, A.S. The effect of prostaglandin E₂ and calcium gluconate on orthodontic tooth movement and root resorption in rats. **Eur. J. Orthod.**, v. 25, n. 2, p. 199-204, Apr. 2003.

SERRA, E.; PERINETTI, G.; D'ATTILIO, M.; CORDELLA, C.; PAOLANTONIO, M.; FESTA, F.; SPOTO, G. Lactate dehydrogenase activity in gingival crevicular fluid during orthodontic treatment. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v. 124, n. 2, p. 206-211, Aug. 2003.

SHERMAN, K.E. Alanine aminotransferase in clinical practice. A review. **Arch. Intern. Med.**, v. 151, n. 2, p. 260-265, Feb. 1991

SHIMADA, S.G.; OTTERNESS, I.G.; STITT, J.T. A study of the mechanism of action of the mild analgesic dipyrone. **Agents Actions.**, v. 41, n. 3-4, p. 188-192, May. 1994.

SHIMIZU, N.; YAMAGUCHI, M.; GOSEKI, T.; OZAWA, Y.; SAITO, K.; TAKIGUCHI, H.; IWASAWA, T.; ABIKO, Y. Cyclic-tension force stimulates interleukin-1 beta production by human periodontal ligament cells. **J. Periodontal. Res.**, v. 29, n. 5, p. 328-333, Sep. 1994.

SHIRAZI, M.; NILFOROUSHAN, D.; ALGHASI, H.; DEHPOUR, A.R. The role of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Angle Orthod.*, v.72, n. 3, p. 211-215, Jun. 2002.

SILVA, G.A.; COSTA, L.M.; BRITO, F.C.; MIRANDA, A.L.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A. New class of potent antinociceptive and antiplatelet 10H-phenothiazine-1-acylhydrazone derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, n. 12, p. 3149-3158, Jun. 2004.

da SILVA, V.C.; CIRELLI, C.C.; RIBEIRO, F.S.; COSTA, M.R.; COMELLI, LIA R.C.; CIRELLI, J.A. Orthodontic movement after periodontal regeneration of class II furcation: a pilot study in dogs. **J. Clin. Periodontol.**, v. 33, n. 6, p. 440-448, Jun. 2006.

SILVEIRA, D.; FRANCO, F.; NASCIMENTO, I.; MILENE, S.; ARAÚJO, T. Alterações periodontais durante a movimentação dentária induzida em ratos. **Rev. Odonto. Cien.**, v. 21, n. 54, p. 332-337, Out/Dez. 2006.

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

STOREY, I.J.; BARLOW, R.M. Experiments in border disease. VI. Lipid and enzyme histochemistry. **J. Comp. Pathol.**, v. 82, n. 2, p. 163-170, Apr. 1972.

SUGIYAMA, Y.; YAMAGUCHI, M.; KANEKAWA, M.; YOSHII, M.; NOZOE, T.; NOGIMURA, A.; KASAI, K. The level of cathepsin B in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. **Eur. J. Orthod.**, v. 25, n. 1, p. 71-76, Feb. 2003.

TATSUO, M.A.; CARVALHO, W.M.; SILVA, C.V.; MIRANDA, A.E.; FERREIRA, S.H.; FRANCISCHI, J.N. Analgesic and antiinflammatory effects of dipyron in rat adjuvant arthritis model. **Inflammation.**, v. 18, n. 4, p. 399-405, Aug. 1994.

TOES, M.J.; JONES, A.L.; PRESCOTT, L. Drug interactions with paracetamol. **Am. J. Ther.**, v. 12, n. 1, p. 56-66, Jan-Feb. 2005.

TOMIZUKA, R.; SHIMIZU, Y.; KANETAKA, H.; SUZUKI, A.; URAYAMA, S.; KIKUCHI, M.; MITANI, H.; IGARASHI, K. Histological evaluation of the effects of initially light and gradually increasing force on orthodontic tooth movement. **Angle Orthod.**, v. 77, n. 3, p. 410-416, May. 2007.

TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 251, n. 2-3, p. 173-179, Jan. 1994.

TORTORICI, V.; VANEGAS, H. Putative role of medullary off- and on-cells in the antinociception produced by dipyron (metamizol) administered systemically or microinjected into PAG. **Pain.**, v. 57, n. 2, p. 197-205, May. 1994.

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

UETRECHT, J.P.; MA, H.M.; MACKNIGHT, E.; MCCLELLAND, R. Oxidation of aminopyrine by hypochlorite to a reactive dication: possible implications for aminopyrine-induced agranulocytosis. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 8, n. 2, p. 226-233, Mar. 1995.

ULICH, T.R.; CASTILLO, J.D.; McNIECE, I.K.; YI, E.S.; ALZONA, C.P.; YIN, S.; ZSEBO, K.M.; Stem cell factor in combination with granulocyte colony-stimulating factor (CSF) or granulocyte-macrophage CSF synergistically increases granulopoiesis in vivo. **Blood.** v. 78, p. 1954, 1991.

VANDEVSKA-RADUNOVIC, V.; KVINNSLAND, I.H.; KVINNSLAND, S.; JONSSON, R. Immunocompetent cells in rat periodontal ligament and their recruitment incident to experimental orthodontic tooth movement. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 105, n. 1, p. 36-44, Feb. 1997.

VANDEVSKA-RADUNOVIC, V.; KVINNSLAND, S.; JONSSON, R. Delayed recruitment of immunocompetent cells in denervated rat periodontal ligament following experimental tooth movement. **J. Dent. Res.**, v. 78, n. 6, p. 1214-1220, Jun. 1999.

VAN'T HOF, R.J.; RALSTON, S.H. Nitric oxide and bone. **Immunology.**, v. 103, n. 3, p. 255-261, Jul. 2001.

VASCONCELOS, M. H. F. **Análise morfológica comparativa do periodonto de sustentação submetido a forças biologicamente excessivas em ratas adultas sem e sob o uso de anticoncepcionais em ratas prenhas.** 1996. 148 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1996.

VANEGAS, H.; TORTORICI, V. Opioidergic effects of nonopioid analgesics on the central nervous system. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 22, n. 5-6, p. 655-661, Dec. 2002.

VAN DE WIJNGAERT, F.; BURGER, E.H. Demonstration of tartrate resistant acid phosphatase in un-decalcified, glycolmethacrylate-embedded mouse bone: A possible marker for (pre) osteoclast identification. **J. Histochemistry and Cytochemistry.**, v. 34, p. 1317-1323. 1986

VERNA, C.; MELSEN, B. Tissue reaction to orthodontic tooth movement in different bone turnover conditions. **Orthod. Craniofac. Res.**, v. 6, n. 3, p. 155-163, Aug. 2003.

VON BÖHL, M.; MALTHA, J.C.; VON DEN HOFF, J.W.; KUIJPERS-JAGTMAN, A.M. Focal hyalinization during experimental tooth movement in beagle dogs. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v. 125, n. 5, p. 615-623, May. 2004.

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

WALDO, C.M.; ROTHBLATT, J.M. Histologic response to tooth movement in the laboratory rat; procedure and preliminary observations. **J. Dent. Res.**, v. 33, n. 4, p. 481-486, Aug. 1954.

WALKER, J.B.; BURING, S.M. NSAID impairment of orthodontic tooth movement. **Ann. Pharmacother.**, v. 35, n. 1, p. 113-115, Jan. 2001.

WEISS, S.J. Tissue destruction by neutrophils. **N. Engl. J. Med.**, v. 320, n. 6, p. 365-376, Feb. 1989.

WISE, G.E.; KING, G.J. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. **J. Dent. Res.**, v. 87, n. 5, p. 414-434, May. 2008.

YAMAGUCHI, M.; SHIMIZU, N.; SHIBATA, Y.; ABIKO, Y. Effects of different magnitudes of tension-force on alkaline phosphatase activity in periodontal ligament cells. **J. Dent. Res.**, v. 75, n. 3, p. 889-894, Mar. 1996.

YAMAGUCHI, M.; AIHARA, N.; KOJIMA, T.; KASAI, K. RANKL increase in compressed periodontal ligament cells from root resorption. **J. Dent. Res.**, v. 85, n. 8, p. 751-756, Aug. 2006.

YAMAGUCHI, M. RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. **Orthod. Craniofac. Res.**, v. 12, n. 2, p. 113-119, May. 2009.

YAMALIK, N.; CAĞLAYAN, F.; KILINÇ, K.; KILINÇ, A.; TÜMER, C. The importance of data presentation regarding gingival crevicular fluid myeloperoxidase and elastase-like activity in periodontal disease and health status. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 3, p. 460-467, Mar. 2000.

YANG, K.D.; HILL, H.R. Neutrophil function disorders: pathophysiology, prevention, and therapy. **J. Pediatr.**, v. 119, n. 3, p. 343-354, Sep. 1991.

YOO, S.K.; WARITA, H.; SOMA, K. Duration of orthodontic force affecting initial response of nitric oxide synthase in rat periodontal ligaments. **Med. Dent. Sci.**, v. 51, n. 1, p. 83-88, Mar. 2004.

ZHANG, X.; KLUGER, Y.; NAKAYAMA, Y.; PODDAR, R.; WHITNEY, C.; DETORA, A.; WEISSMAN, S.M.; NEWBURGER, P.E. Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli. **J. Leukoc. Biol.**, v.75, n. 2, p. 358-372, Feb. 2004.

ZIRA, A.; MIKROS, E.; GIANNIOTI, K.; GALANOPOULOU, P.; PAPALOIS, A.; LIAPI, C.; THEOCHARIS, S. Acute liver acetaminophen toxicity in rabbits and the use of antidotes: a metabonomic approach in serum. **J. Appl. Toxicol.**, v. 29, n. 5, p. 395-402, Jul. 2009.