



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**Priscila Macêdo França da Silva**

**Efeito do ácido zoledrônico na resposta inflamatória em modelo de movimentação  
ortodôntica com ancoragem esquelética em ratos**

**FORTALEZA**

**2021**

Priscila Macêdo França da Silva

**Efeito do ácido zoledrônico na resposta inflamatória em modelo de movimentação  
ortodôntica com ancoragem esquelética em ratos**

Dissertação de mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Odontológica; Área temática: Estomatopatologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves

FORTALEZA

2021

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

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

---

- S582e Silva, Priscila Macêdo França da.  
Efeito do ácido zoledrônico na resposta inflamatória em modelo de movimentação ortodôntica com ancoragem esquelética em ratos / Priscila Macêdo França da Silva. – 2021.  
84 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2021.  
Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.
1. Procedimentos de ancoragem ortodôntica. 2. Bisfosfonatos. 3. Ácido Zoledrônico. 4. Osteonecrose. I. Título.

CDD 617.6

---

Priscila Macêdo França da Silva

**Efeito do ácido zoledrônico na resposta inflamatória em modelo de movimentação ortodôntica com ancoragem esquelética em ratos**

Dissertação de mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Odontológica; Área temática: Estomatopatologia.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves (Orientadora)**

Universidade Federal do Ceará – UFC

---

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Lis Monteiro de Carvalho Guerra**

Centro Universitário Christus - UNICHRISTUS

---

**Prof.<sup>o</sup> Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior**

Universidade Federal do Ceará - UFC

Ao Pastor Martins Micaias.

## AGRADECIMENTOS

“Somos resultados de esforços que muitas vezes não são nossos”. Sendo assim, é inesgotável o reconhecimento do esforço de muitos que se fizeram presente de forma afetiva e também àqueles que participaram propriamente da execução deste projeto.

Agradeço ao **Pastor Martins Micaias** por ter sonhado e acreditado tanto, por ser verdadeiramente Profeta, e “ser” por mim em tantas e tantas madrugadas. Muito obrigada!

Aos meus pais, **Antônio França e Maria do Carmo** e minha irmã **Pâmela**, pelo apoio, incentivo e principalmente pela liderança exercida através do exemplo. A minha tia, **Cleide** e amiga **Lúcia** pela imensa disponibilidade e cuidado comigo nesse tempo.

A minha orientadora, **Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, por ter “abraçado” este projeto e principalmente pela sua entrega. Seu trabalho de excelência e exemplo profissional são realmente inspiradores. Agradeço demais o seu cuidado, ensinamentos e dedicação. O seu sim, foi uma resposta de Deus a muitas orações que eu havia feito!

Ao **Prof.<sup>o</sup> Dr. Fabrício Bitú**, meu professor favorito de toda a graduação. Aquele que tem uma sensibilidade especial por todos os pacientes. Minha admiração pelo senhor é infindável. Só tenho muito orgulho de ser sua aluna!

Aos professores, **Dr. Paulo Goberlânio, Dr. Mário Mota, Dra. Karuza Alvez** pela paciência, simplicidade e por todos os ensinamentos compartilhados. Foi uma honra gigante conviver com vocês!

Aos amigos pós-graduandos do Laboratório de Patologia Bucal, em especial **Ronildo, Farah, Guilherme, Sthefane, Ernando, Milena, Isabelly, Pedro e Imaculada, Elisa e Karine** pela convivência, apoio pessoal, apoio na execução do protocolo e principalmente por terem sido suporte e coluna nesse processo.

A amiga e professora **Thâmara Bezerra**, por me envolver nesse mundo da Patologia de uma forma tão leve. Muito obrigada por todos os ensinamentos, e tantas experiências compartilhadas. Obrigada por ajudar tanto!

A **Ilanna Mara Gomes Estanislau e Vilana Maria Adriano Araújo**, por todo apoio, paciência e por aceitarem participar dos experimentos em meio a tantas tarefas diárias. Vocês me acolheram desde o início e permaneceram dispostas durante todo esse tempo. Sempre lembrarei disso!

Aos alunos de iniciação científica, **Mariana Dantas, Manuela, Dênis, Marta, Lucas, Mariana Kalena, Lorena, Ingrid e Pedro** que contribuíram tanto na execução do experimento. Sou grata pelo apoio de vocês!

Aos amigos de dentro e fora da Odontologia que “seguraram a corda” e estiveram além dos corredores da UFC compartilhando momentos e eventualmente se dedicando a algo que não era diretamente deles, **Samia, Will, Reninho, Edson, Natan, Diego, Bryanny e Carla**. Vocês foram essenciais!

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGO-UFC), Clínica de Estomatologia (UFC), Laboratório de Patologia Bucal (UFC) e Núcleo de Estudos em Pacientes Especiais (NEPE)** pela vivência, ensinamentos e tantas experiências adquiridas nesses anos.

À **Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP)**, pela concessão da bolsa de estudos.

“Creiam no SENHOR, no vosso Deus,  
e ficarão firmes. Creiam nos seus  
profetas e tudo correrá bem!”  
2 Crônicas 20:19

## RESUMO

O Ácido Zoledrônico (AZ) trata-se do mais potente bisfosfonato para uso clínico, empregado por via endovenosa, atuando especialmente nos eventos relacionados às metástases ósseas. Este trabalho tem o objetivo de comparar o efeito deste fármaco nos aspectos cicatriciais do tecido ósseo de suporte de um dispositivo temporário de ancoragem e nas características inflamatórias e morfológicas do tecido ósseo dentário submetido à movimentação dentária induzida (MDI) em um modelo experimental com ancoragem esquelética. Para tanto, foram utilizados 48 ratos machos, da linhagem *Wistar* (350g), divididos em dois grupos experimentais que receberam três administrações consecutivas do AZ (0,2 mg/kg) ou da solução salina estéril 0,9% (grupo controle) (dias 0, 7 e 14). Os animais foram submetidos à instalação de uma mola fechada de CrNi, a qual foi fixada entre o primeiro molar superior esquerdo e o mini-implante (MI) no dia 42. O lado direito de ambos os grupos não recebeu força ortodôntica, servindo como controle interno. O deslocamento do 1ºMSE e do MI foram mensurados com um paquímetro digital. Os animais foram submetidos à eutanásia nos dias 49, 56, 63 e 70, sendo o primeiro molar superior dos dois lados avaliado com lâminas histológicas coradas com Hematoxilina e Eosina no que se refere aos fenômenos pulpares e periodontais em cada tempo de MDI. O espaço microscópico da movimentação foi analisado com a régua histológica Zeiss® e o tecido ósseo de suporte do MI quanto aos parâmetros inflamatórios e cicatriciais. Além disso, verificou-se a relação entre o percentual de colágeno do tipo I e III através da reação histoquímica de Picrosirius Red após polarização da luz. A análise macroscópica evidenciou no grupo controle uma diminuição significativa da distância do 1ºMSE ao MI com 28 dias de ativação ortodôntica, e da variação da área de triângulos irregulares nos dias 21 e 28 ( $p < 0,05$ ). Além disso, verificou-se histologicamente o aumento significativo do deslocamento dentário nos dias 21 e 28 ( $p < 0,05$ ). O primeiro molar superior esquerdo não mostrou diferença significativa quanto aos fenômenos pulpares e periodontais entre os grupos ao longo do período analisado e o tempo de MDI não influenciou significativamente na intensidade das alterações nos grupos ( $p > 0,05$ ). As células epiteliais de Malassez mostraram redução significativa no grupo AZ no lado em que não houve MDI e no grupo controle no lado em que houve a movimentação ( $p < 0,05$ ) em relação ao tempo de indução ortodôntica. Uma redução significativa da relação entre o colágeno tipo I e III foi observada no grupo AZ no dia 14 ( $p < 0,05$ ). A área adjacente ao defeito ósseo promovido pela inserção do MI demonstrou aumento significativo das lacunas de osteócitos vazias no grupo AZ nos dias 14, 21 e 28 e na área distante do MI nos dias 21 e 28 ( $p < 0,05$ ), sem correlação significativa com a disposição do infiltrado inflamatório ( $p > 0,05$ ). O aumento do tempo de MDI não influenciou significativamente a intensidade do processo inflamatório entre os grupos, que mostrou-se difuso no grupo AZ nos dias 7 e 28 ( $p < 0,05$ ) e predominantemente, neutrofilico no dia 28. Em suma, o AZ reduziu o deslocamento dentário, não interferindo no tecido pulpar e periodontal de forma direta, e sim na redução do percentual das células de malassez quando não houve MDI. A administração do fármaco não alterou o processo de reparo proporcionado pelas fibras colágenas do ligamento periodontal, mas modificou os parâmetros cicatriciais do tecido ósseo de suporte do MI, provavelmente, em associação ao trauma da instalação do dispositivo de ancoragem, sem caracterizar quadro de osteonecrose.

**Palavras-chave:** Procedimentos de ancoragem ortodôntica, bisfosfonatos, ácido zoledrônico, osteonecrose.

## ABSTRACT

Zoledronic acid (ZA) is the most powerful bisphosphonate for clinical use, used intravenously, acting especially in events related to bone metastases. This research aims to compare the effect of this drug in the scarring aspects of the supporting bone tissue of a temporary anchorage device and in the inflammatory and morphological characteristics of bone tissue subjected to induced tooth movement (ITM) in an experimental model with skeletal anchorage. For this purpose, 48 male Wistar rats (350g) were used, divided into two experimental groups that received three consecutive administrations of ZA (0,2 mg/kg) or 0.9% sterile saline solution (control group) (days 0, 7 and 14). The animals were submitted to the installation of a closed CrNi spring, which was fixed between the upper left first molar and the mini-implant (MI) on day 42. The right side of both groups did not receive orthodontic strength, serving as an internal control. The displacement of the upper left first molar and MI were measured with a digital caliper. The animals were found after euthanasia on days 49th, 56th, 63th and 70th, with the upper first molar on both sides being evaluated with histological slides stained with hematoxylin and eosin in which refers to pulpal and periodontal phenomena at each time of ITM. The microscopic space of the movement was analyzed with the Zeiss® histological ruler and the bone supporting tissue of the MI regarding inflammatory and scarring parameters. Besides that, the relation between the percentage of collagen types I and III was verified through the histochemical reaction of Picrosirius Red after light polarization. A macroscopic analysis showed a small decrease in the control group of the distance from the upper left first molar to the MI with 28 days of orthodontic activation, and the variation in the area of irregular triangles on days 21st and 28th ( $p < 0,05$ ). It was also evidenced, histologically, a significant increase in tooth displacement in the control group on days 21 and 28 ( $p < 0,05$ ). The upper left first molar did not show any significant difference regarding pulp and periodontal phenomena between the groups throughout the analyzed period and the ITM time did not influence the intensity of the alterations in the groups ( $p > 0,05$ ). The epithelial cells of Malassez reduce the reduction in group ZA on the side where there was no ITM and in the control group on the side where there was movement ( $p < 0,05$ ) in relation to the time of orthodontic induction. A significant reduction in the relationship between collagen type I and type III was observed in group ZA on day 14th ( $p < 0,05$ ). The adjacent area to the defected bone promoted by MI insertion showed significantly increased empty osteocyte lacunae in the group ZA on days 14, 21st and 28th and in the area distant from MI on days 21 and 28 ( $p < 0,05$ ), with no relationship related to the disposition of the inflammatory infiltrate ( $p > 0,05$ ). The increase in ITM time did not influence the intensity of the inflammatory process between the groups and the disposition of the inflammatory infiltrate was shown to be diffuse in the group ZA on days 7th and 28th ( $p < 0,05$ ), becoming predominantly neutrophilic on the day 28th. In short, group ZA reduced tooth displacement, not directly interfering with the pulp and periodontal tissue, but in reducing the percentage of malassez of cells when there was no ITM. The administration of the drug did not change the repair process provided by the collagen fibers of the periodontal ligament, but it did change the healing parameters of the MI support bone tissue, probably in association with the trauma of the installation of the anchoring device, without characterizing an osteonecrosis.

**Keywords:** Orthodontic anchorage procedures, bisphosphonates, zoledronic acid, osteonecrosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figuras 1A e B:</b> Estrutura química dos BFs e AZ.....	17
<b>Figura 2:</b> Diagrama esquemático do protocolo experimental. ....	64
<b>Figura 3:</b> Desenho esquemático do modelo de MDI com ancoragem esquelética (Vista lateral). .....	64
<b>Figura 4:</b> Desenho esquemático da mensuração macroscópica da MDI. O triângulo ilustrado na cor preta foi obtido a partir das medidas A, B e C (Vista oclusal). ....	65
<b>Figura 5:</b> Avaliação microscópica da movimentação dentária induzida em milímetros (mm) mensurada com régua histológica entre o 1º e 2º MSE. ....	65
<b>Figuras 6A e B:</b> Análise do percentual de colágeno total no lado não movimentado e movimentado, respectivamente. ....	66
<b>Figuras 7A e B:</b> Análise da relação entre o colágeno tipo I e III no lado não movimentado e movimentado, respectivamente. ....	67
<b>Figuras 8A e B:</b> Análise do percentual de lacunas de osteócitos vazias adjacentes e distantes da área de inserção do MI, respectivamente. ....	68
<b>Figura 9:</b> Fotomicrografias longitudinais do primeiro molar superior no lado não submetido a MDI no qual se avaliaram os fenômenos pulpares. ....	68
<b>Figura 10:</b> Fotomicrografias longitudinais do primeiro molar superior no lado submetido a MDI no qual se avaliaram os fenômenos pulpares. ....	69
<b>Figura 11:</b> Fotomicrografias longitudinais da região interproximal entre o 1º e 2º molar superior do lado não submetido a MDI no qual se avaliaram os fenômenos periodontais. ....	70
<b>Figura 12:</b> Fotomicrografias longitudinais da região interproximal entre o 1º e 2º molar superior do lado submetido a MDI no qual se avaliaram os fenômenos periodontais. ....	71
<b>Figura 13:</b> Fotomicrografia do perfil do colágeno na região do LP entre o 1º e 2º molar superior do lado não submetido a MDI. ....	72
<b>Figura 14:</b> Fotomicrografia do perfil do colágeno na região do LP entre o 1º e 2º molar superior do lado submetido a MDI. ....	73
<b>Figura 15:</b> Fotomicrografias do tecido ósseo adjacente à área de inserção do MI. ....	74
<b>Figura 16:</b> Fotomicrografias do tecido ósseo distante da área de inserção do MI. ....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Tipos e exemplos de Bisfosfonatos de acordo com a geração. ....	16
<b>Tabela 2:</b> Análise qualitativa e quantitativa do infiltrado inflamatório no tecido ósseo de suporte do Mini-implante. ....	62
<b>Tabela 3:</b> Análise histológica do lado não movimentado e movimentado em relação aos escores atribuídos aos fenômenos pulpares e periodontais e porcentagem da presença das células epiteliais de Malassez. ....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

AZ	Ácido Zoledrônico
BFs	Bisfosfonatos
BFsN	Bisfosfonatos nitrogenados
BFsnN	Bisfosfonatos não-nitrogenados
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CR	Centro de resistência
CrNi	Níquel-Cromo
DTA	Dispositivos temporários de ancoragem
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EV	Endovenosa
GAZ	Grupo tratado com Ácido Zoledrônico
GC	Grupo tratado com Solução salina
HE	Hematoxilina-Eosina
IL-10	Interleucina 10
ISE	Incisivo superior esquerdo
LP	Ligamento periodontal
MDI	Movimentação dentária induzida
MI	Mini-implante
MMP	Metaloproteinases
OMB	Osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos
OPG	Osteoprotegerina
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
RANK-L	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
CEM	Células epiteliais de Malassez

TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
VO	Via oral
1°MSD	Primeiro molar superior direito
1°MSE	Primeiro molar superior esquerdo
2°MSE	Segundo molar superior esquerdo

## LISTA DE SÍMBOLOS

mm	Milímetros
N	Newton
gF	Gramma-força
cN	Centinewton
®	Marca Registrada
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
%	Porcentagem/Percentual

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL .....	16
1.1 Ácido Zoledrônico .....	16
1.2 Modelo experimental de Movimentação dentária induzida (MDI) com ancoragem esquelética.....	18
1.3 Desregulação inflamatória e morfológica mediada pelo AZ no tecido ósseo submetido a MDI.....	21
2 JUSTIFICATIVA .....	26
3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	27
3.1 Hipótese nula .....	27
3.2 Hipótese alternativa .....	27
4 OBJETIVOS.....	28
4.1 Objetivo geral.....	28
4.2 Objetivos específicos .....	28
5 CAPÍTULO .....	29
5.1 Capítulo 1.....	29
6 CONCLUSÃO GERAL .....	76
7 REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO GERAL).....	77

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Ácido Zoledrônico

O Ácido zoledrônico (AZ) trata-se de um fármaco pertencente a classe dos Bisfosfonatos (BFs), de terceira geração. Apesar de possuir meia vida plasmática curta (WANG *et al.*, 2020), é altamente absorvido pelo tecido ósseo, agindo idealmente no tratamento de doenças ósseas metastáticas, osteoporose, além de sua atividade anti-tumoral (CHIARELLA *et al.*, 2020; REDDY *et al.*, 2017).

Os BFs possuem atuação semelhante aos pirofosfatos endógenos (P-O-P) (reguladores fisiológicos da calcificação e reabsorção óssea) (TATLI *et al.*, 2014). Constituem-se, portanto, em compostos com as propriedades antidesmineralizantes do pirofosfato, mais resistentes à hidrólise, porque contém ligações estáveis (P-C-P) no lugar de ligações lábeis (P-O-P) (IZQUIERDO *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2020). São potentes inibidores da reabsorção óssea e efetivos na redução das concentrações séricas de cálcio em pacientes com hipercalcemia maligna (REDDY *et al.*, 2017). Além disso, reduzem o índice de complicações esqueléticas do mieloma múltiplo e do câncer de mama avançado (VENKATARAMANA *et al.*, 2014).

Existem vários tipos de BFs para uso clínico, com seus efeitos variando de acordo com a geração a que pertencem. Do ponto de vista farmacológico, são subdivididos em nitrogenados (BFsN) e não nitrogenados (BFsnN) (ALRAHABI; GHABBANI, 2018), empregados por via oral (VO) ou endovenosa (EV) (SOARES *et al.*, 2016). Os BFs EV incluem o pamidronato, um bisfosfonato de segunda geração e o AZ, o mais potente de uso clínico (Tabela 01), e objeto dessa pesquisa.

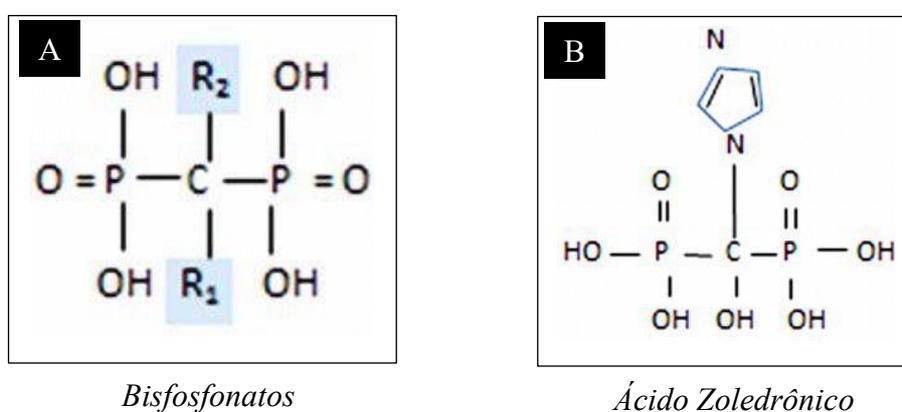
**Tabela 1:** Tipos e exemplos de Bisfosfonatos de acordo com a geração.

Geração	Tipo de Bisfosfonato	Exemplo
Primeira geração	Sem nitrogênio	Etidronato
Segunda geração	Alquil-amino sem nitrogênio	Pamidronato, Alendronato
Terceira geração	Com nitrogênio heterocíclico	Risedronato, Zoledronato

Fonte: Adaptado de AJWA, 2019.

As diferenças farmacocinéticas dos BFs revelam que o AZ apresenta a maior afinidade com a hidroxiapatita do osso mineralizado, o que caracteriza a sua longa duração de ação quando comparado a outras drogas de sua classe, além da maior inibição da osteoclastogênese (HORTOBAGYI *et al.*, 2019). A potência da anti-reabsorção pode ser explicada estruturalmente pela substituição das cadeias laterais R1 e R2, responsáveis pela ligação dos BFs ao osso, possuindo o AZ, um grupo imidazol heterocíclico ligado a posição R2, tornando-o mais potente (BOWDEN; MAHAN, 2017) (Figuras 01A e 01B).

**Figuras 1A e B:** Estrutura química dos BFs e AZ.



**Legenda:** A - Estrutura geral dos BFs. As cadeias R1 e R2 podem ser alteradas, modificando a capacidade de ligação a hidroxiapatita e potência. B - Estrutura do AZ com um anel Imidazol contendo dois átomos de nitrogênio (Fonte: Adaptado de BOWDEN; MAHAN, 2017).

O mecanismo de ação do AZ envolve a apoptose dos osteoclastos, assim como ocorre nos outros BFsN (YANG; DU, 2015), inativando a via do Mevalonato através da inibição de uma enzima regulatória essencial para a função e formação dos osteoclastos, a Farnesil difosfato sintase (SOARES *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2020). Carbonare *et al.* (2017) relataram tanto a inibição da remodelação óssea, como a capacidade anabólica do AZ em pacientes com osteoporose, especialmente pelo estímulo da atividade osteoblástica após inibição do turnover, o que gera aumento da densidade óssea.

Destacando-se pela sua ação antiproliferativa em diferentes linhagens celulares, o AZ possui atividade anti-angiogênica, inibindo a ativação de fatores pró-angiogênicos (JIANG *et al.*, 2016), além da sua ação nas micro-metástases e apoptose de células tumorais (WANG *et al.*, 2020). Um aumento da sobrevida global e livre da doença, é observado em pacientes tratados com terapias adjuvantes envolvendo o AZ (LIU *et al.*, 2019; YANG; DU, 2015).

A administração deste fármaco ocorre nos pacientes em uma dose de 4 mg, sendo a infusão durante 15 minutos a cada 12 semanas ou em intervalos menores de 3 a 4 semanas (HORTOBAGYI *et al.*, 2019). Em tratamentos de duração prolongada podem ocorrer eventos adversos graves, tais como, fraturas ósseas e a osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos (OMB), onde, o AZ é o principal BFsN associado a esta condição (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

A OMB atinge mais frequentemente o osso mandibular, com patogenia ainda não completamente definida (ZAGO *et al.*, 2020). A inibição da atividade osteoclástica causa diminuição da capacidade de remodelamento ósseo, propiciando o desenvolvimento da necrose numa situação em que haja trauma na região óssea. A atividade anti-angiogênica diminui o suprimento vascular, possibilitando a ocorrência de isquemia e, conseqüentemente, necrose tecidual. Vale ressaltar, que a duração do tratamento com AZ e a frequência de infusão estão diretamente relacionadas a ocorrência de efeitos colaterais (BIGUETTI *et al.*, 2019; IZQUIERDO *et al.*, 2011).

## **1.2 Modelo experimental de Movimentação dentária induzida (MDI) com ancoragem esquelética**

A MDI ocorre com a aplicação de uma força mecânica controlada, e resulta em respostas celulares que modelam e remodelam os tecidos dentais circundantes, especialmente, osso alveolar e ligamento periodontal (LP). Basicamente, as modificações teciduais são induzidas por mediadores químicos e neurotransmissores, que ativam os osteoclastos para o processo de reabsorção óssea alveolar no lado de pressão, e os osteoblastos, para a aposição no lado de tensão (BROOKS *et al.*, 2009; KITAURA *et al.*, 2014). Durante a movimentação ortodôntica, em resposta a carga aplicada, o osso alveolar sofre uma remodelação coordenada permitindo o deslocamento dentário, sendo esse processo resultado da comunicação entre osteoclastos, osteoblastos e osteócitos (SHOJI-MATSUNAGA *et al.*, 2017).

Burstone (1962) dividiu o movimento dentário em fases, consistindo em: fase inicial aquela que ocorre logo após a aplicação da força e se caracteriza pelo deslocamento do dente no LP, fase de latência, onde ocorre pouco ou nenhum deslocamento em virtude do processo de hialinização, e, por último, uma fase pós latência, em que ocorre aumento gradual ou repentino da movimentação dentária (ASIRY, 2018).

A resistência a mudança no posicionamento dos dentes indesejados, trata-se de uma das partes essenciais do planejamento do tratamento ortodôntico sendo definida como ancoragem

(IGLESIAS-LINARES *et al.*, 2010), podendo ser fornecida de forma intra ou extra-oral. Dentes e palato, através do uso de barras transpalatinas, e a cabeça ou o pescoço, pelo uso de aparelhos externos, são considerados métodos convencionais e possuem baixa taxa de adesão dos pacientes, além de benefícios questionáveis (ANTOSZEWSKA-SMITH *et al.*, 2017). No entanto, o uso de implantes ou mini-implantes (MIs) atua como alternativa aos métodos tradicionais, e são especialmente atrativos, pela não necessidade de cooperação do paciente para que o movimento dos dentes ocorra (RUAN *et al.*, 2018).

O conceito de ancoragem esquelética surgiu na Ortodontia com o advento dos implantes. As cargas ortodônticas de natureza contínua, unidirecional e de baixa magnitude não conseguem gerar atividade osteolítica na interface óssea do implante, e a ausência de movimentação nestes aparatos permite maior previsibilidade de tratamentos complexos. Além disso, esses dispositivos são de baixo custo, dimensões variadas, podem ser facilmente inseridos ou removidos do tecido ósseo e permitem pequena redução no tempo de tratamento (ANTOSZEWSKA-SMITH *et al.*, 2017; ARAÚJO *et al.*, 2006, MARIGO *et al.*, 2016).

Dentre as aplicabilidades clínicas do uso dos MIs podemos citar a correção da má-oclusão de classe II, caracterizada pela protrusão dento-alveolar, em que geralmente o plano de tratamento inclui a retração dos incisivos superiores com ancoragem máxima, após a extração de dois pré-molares bilaterais. Além disso, podem ser utilizados na retração de caninos, intrusão de dentes anteriores ou posteriores e mesialização ou distalização de molares, permitindo o deslocamento de dentes específicos na unidade de ação, sem efeitos adversos nos demais (HEDAYATIE; SHOMALI, 2016).

Diferentemente dos implantes osseointegráveis compostos por titânio puro, os MI são fabricados com uma liga de titânio que apresenta maior resistência mecânica do que o titânio puro, especialmente porque a utilização desses sistemas tem como pré-requisito a estabilidade mecânica (primária), e não a estabilidade secundária, advinda da osteointegração (NOVA *et al.*, 2008). A resistência a forças entre 30g e 250g, necessárias em alguns movimentos ortodônticos, é fornecida especialmente pela estabilidade primária (KHAN *et al.*, 2016), e a liga de titânio que os compõem possui características bioativas inferiores ao titânio comercialmente puro, e o grau de osteointegração é baixo (NOVA *et al.*, 2008).

No que se refere a aplicação imediata ou não de carga mecânica logo após a instalação do MI, a literatura é controversa. Alguns autores relatam que o tempo para a consolidação óssea antes da ativação de forças ortodônticas não seria necessário, já que a estabilidade primária suportaria as cargas mecânicas aplicadas. No entanto, também é sugerido um tempo reduzido

de espera no intuito de minimizar as falhas de retenção e evitar mobilidade dos dispositivos (KHAN *et al.*, 2016).

Na tentativa de compreender os mecanismos biológicos envolvidos na MDI, modelos animais de ratos e camundongos têm sido utilizados em estudos experimentais, variando além do ‘design’ do aparelho ortodôntico, a intensidade da força aplicada, os períodos de movimentação e os cortes empregados para a análise microscópica (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2015, FRACALOSSO, 2007). Gudhimella *et al.* (2019) relata que um modelo animal aceitável de MDI deve promover direção constante da força mecânica, também de magnitude adequada, e métodos precisos de verificação do deslocamento dentário.

Um modelo amplamente empregado para estudar a MDI foi introduzido por Heller e Nanda (1979), e modificado por Martins-Ortiz (2004), e utiliza uma mola fechada de aço inoxidável adaptada do primeiro molar superior esquerdo aos incisivos centrais superiores através de um fio de amarrilho. Ainda, é utilizado resina composta para criar uma retenção adicional (FRACALOSSO *et al.*, 2009). Essa modalidade de ancoragem garante pouca resistência ao movimento dentário indesejado, resultando em mudanças na posição dos elementos de suporte, bem como em alterações das forças ortodônticas inicialmente aplicadas (PROFFIT *et al.*, 2013). Essas desvantagens são ressaltadas quando incisivos de ratos são utilizados como elementos de ancoragem mínima, já que os mesmos estão em constante erupção (KAMEYAMA *et al.*, 2002).

Estudos prévios em modelos com MIs como o de Gudhimella *et al.* (2019), Kaipatur *et al.* (2013) e Kaipatur *et al.* (2014) demonstraram segurança na utilização do modelo experimental de MDI com ancoragem esquelética, onde ratos foram submetidos a mesialização ortodôntica dos seus primeiros molares superiores utilizando molas de níquel-titânio adaptadas entre o molar a ser mesializado e o MI. Este modelo de movimentação dentária tem sido utilizado tanto para investigar o efeito da carga óssea de medicamentos no movimento ortodôntico, estimar a tensão e estabilidade do MI no osso cortical, como para avaliar o efeito de baixas forças no volume ósseo radicular de roedores.

Em modelos de ancoragem dentária, Kameyama *et al.* (2002) relataram a mudança na direção da força aplicada à medida que os incisivos são erupcionados, a quebra mais facilmente da mola e seu afastamento da mucosa palatina. Entretanto, quando o molar é tracionado se utilizando de parafusos de titânio, tem-se a mola com menor hipótese de deslocamentos ou quebras e direção de força que não é modificada, permitindo mantê-la com precisão durante o tempo experimental.

Semelhante ao proposto por Fernández-González *et al.* (2015); Kaipatur *et al.* (2013), Kaipatur *et al.* (2014) e Kawazoe *et al.* (2013), e em virtude da escassez de modelos animais de ancoragem esquelética disponíveis, além da falta de padronização dos dispositivos utilizados, um grupo de pesquisadores desenvolveu o modelo experimental proposto para este estudo com o uso de ancoragem esquelética em ratos (ESTANISLAU, 2019). Para isso, um dispositivo temporário de ancoragem (DTA) é instalado na região anterior da maxila, se propondo a obter a mesialização do primeiro molar superior situado no lado contralateral, de modo a realizar estudos concernentes a taxa de MDI e análise de variados parâmetros inflamatórios e morfológicos envolvidos no deslocamento dentário.

### **1.3 Desregulação inflamatória e morfológica mediada pelo AZ no tecido ósseo submetido a MDI**

Na biomecânica do movimento ortodôntico, uma das hipóteses mais antigas é conhecida como “pressão-tensão” e explica a remodelação óssea propondo diferentes processos biológicos nas áreas de compressão e tensão a partir das células presentes no LP. Na área de compressão é esperado alteração do fluxo sanguíneo, áreas hialinas, reabsorção óssea e degradação do colágeno tipo I. Já na área de tensão, as células-tronco mesenquimais se diferenciam em osteoblastos e formam osteóide ou matriz de colágeno tipo I, seguido de mineralização (JIANG *et al.*, 2016).

Para que todos esses eventos ocorram e promovam o movimento dentário, uma alteração do fluxo sanguíneo periodontal libera citocinas, neurotransmissores e outras moléculas, no intuito de gerar respostas bioquímicas e celulares desencadeantes da remodelação de tecidos tanto mineralizados como não mineralizados (D’APUZZO *et al.*, 2013; RANGIANI *et al.*, 2016). Por serem ricamente celularizados, os tecidos da polpa e LP quando estímulos são aplicados, dependendo da intensidade, frequência e duração, é possível visualizar microscopicamente alterações morfológicas e/ou de perfil inflamatório, influenciadas por fatores sistêmicos e locais (D’APUZZO *et al.*, 2013; MASSARO *et al.*, 2009), a exemplo do uso de BFs e o tratamento ortodôntico, respectivamente.

Estudos concernentes às modificações pulpares observadas após a MDI, apresentam metodologias e resultados variáveis. Inicialmente, foram atribuídas às forças ortodônticas, a necrose e atresia pulpar e/ou do canal radicular (RAMAZANZADEH *et al.*, 2009). Massaro *et al.* (2009) relataram que as alterações vasculares encontradas não eram permanentes, nem degenerativas, e as metabólicas não alteravam morfológicamente o tecido pulpar, embora

microscopicamente, a presença de células inflamatórias, fibrose e redução de vasos sanguíneos já tenham sido associados a sinais de degeneração.

As respostas inflamatórias e adaptativas intra-pulpaes foram sugeridas por Römer *et al.* (2014) após verificarem a diminuição do suprimento de oxigênio resultante da indução de forças ortodônticas, demonstrando que a polpa dentária sofre um processo de remodelação diante da MDI. Outros sinais atribuídos às cargas mecânicas foram a vacuolização e/ou descontinuidade da camada de odontoblastos, congestão vascular e edema (RAMAZANZADEH *et al.*, 2009; SANTAMARIA JR *et al.*, 2007).

Em relação ao LP, a aplicação de força leves ou moderadas promovem alterações biológicas que culminam na formação de um infiltrado inflamatório leve. Como a força aplicada é dissipada ao redor dos tecidos, após 7 ou 10 dias, na ausência de cargas ativas, os fenômenos periodontais passam a ser reparadores no sentido de tornar os tecidos aptos a receber forças novas (CONSOLARO; CONSOLARO, 2018). Eventualmente, a carga mecânica induzida promove deformação dos vasos sanguíneos do LP na direção da força, causando hialinização, caracterizada por áreas livres de células, presença de detritos e matriz extracelular, além da obstrução da vascularização, e ausência ou redução do movimento dentário. Em modelos animais, áreas hialinizadas foram encontradas 24 horas após o início da força ortodôntica, ocorrendo pouco ou nenhum deslocamento dentário (ARIFFIN *et al.*, 2011).

No LP estão presentes tanto células epiteliais como os restos epiteliais de Malassez (REM), como as mesenquimais, tais como, osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos (XIONG *et al.*, 2000). Os REM tratam-se de um aglomerado de células epiteliais odontogênicas que ainda permanecem no periodonto adulto, derivados da fragmentação da bainha epitelial de Hertwig (XIONG *et al.*, 2000). Em relação ao movimento dentário ortodôntico, estudos indicam que eles estariam envolvidos com manutenção do reparo pós-MDI, induzindo a cementogênese e proliferando concomitantemente a movimentação dentária (KEINAN; COHEN, 2013; TALIC *et al.*, 2003). Além disso, expressam receptores para o Fator de crescimento epidérmico (FCE) (SILVA *et al.*, 2017), o qual Guajardo *et al.* (2000) sugeriram que está relacionado a proliferação dos tecidos periodontais necessária para ocorrer a MDI.

Os receptores para o FCE atuam como um importante condutor para a diferenciação das células epiteliais, e verificou-se *in vitro* que o AZ interage com esses receptores. A proliferação e capacidade migratória dos queratinócitos orais humanos foram suprimidas pelo tratamento com o AZ, mas puderam ser em parte revertidos pelo FCE, tornando-se uma possível opção terapêutica para toxicidade direta dos BFs em mucosa oral (WANG *et al.*, 2019).

Por outro lado, os fibroblastos desempenham um importante papel na MDI pela formação das proteínas estruturais do colágeno. Mudanças na tensão mecânica aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias, em especial as prostaglandinas pelo aumento de COX-2. Isso altera os níveis de RANK-L e OPG, produzidos por osteoblastos e fibroblastos presentes no LP, e de IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ . Uma expressão diferenciada desses mediadores ocorre no sítio de compressão com aumento da expressão dos fatores de osteoclastogênese e no lado de tensão, com aumento de fatores osteogênicos (SANTOS, 2017; SCHRÖDER *et al.*, 2020).

Dessa forma, no lado de compressão ocorre liberação de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) que aumentam a diferenciação osteoblástica e a expressão de RANK-L e OPG. Um aumento de RANK-L e uma diminuição na liberação de OPG pelos osteoblastos favorece a reabsorção óssea pelos osteoclastos. Sob tensão, aumenta o número de osteoblastos e liberação da citocina IL-10, aumentando a OPG e reduzindo a produção de RANK-L, conseqüentemente, diminuindo a sinalização RANK, responsável pela ativação dos osteoclastos, criando um microambiente favorável para a formação do tecido ósseo (LI *et al.*, 2018).

Marzano-Moreno *et al.* (2018) demonstraram que BFs como o Zoledronato, pode modificar a expressão de genes envolvidos com a diferenciação de osteoblastos, através do eixo RANKL – OPG, resultando em acúmulo de osso mineralizado e não renovado. Uma diminuição de RANK-L, seguido do aumento de OPG, foi encontrada em pacientes usuários de AZ, sugerindo que temporalmente este fármaco poderia modificar a expressão de moléculas envolvidas na maturação e fusão de pré-osteoclastos (MERCATALI *et al.*, 2013).

Acrescenta-se, ainda, que as alterações da matriz extracelular do LP promovidas pela indução ortodôntica, incluem o aumento na produção de metaloproteinases de matriz (MMPs) que podem ser classificadas em vários grupos, como a MMP-8, a qual já tem seu aumento relatado após 12h da aplicação das forças compressivas, indicando a degradação do colágeno (SCHRÖDER *et al.*, 2018). Em suma, o movimento ortodôntico produz duas principais ações no LP: altera o conteúdo de colágeno e induz a osteoclastogênese. As fibras colágenas que unem o dente ao osso são principalmente de colágeno Tipo I, predominante, maduro e responsável por fornecer estabilidade ao dente, e o Tipo III, que alivia a tensão no LP durante a MDI (LI *et al.*, 2019).

A taxa de movimentação ortodôntica varia conforme a força aplicada e suas características físicas, além da resposta biológica do LP (RANGIANI *et al.*, 2016), e pode ser dificultada pelo potencial farmacológico de alguns medicamentos em alterar a fisiologia óssea, tais como os BFs (KRISHNAN *et al.*, 2015). Os BFsN podem interromper os eventos celulares responsáveis pela integridade e reparo dos tecidos periodontais durante a MDI, afetado além do

deslocamento dentário, a angiogênese e reorganização tecidual, principalmente pelo AZ (FRANZONI *et al.*, 2017). SILVA *et al.* (2015) descreveram que a constante presença do AZ no tecido ósseo em virtude da sua alta afinidade pela hidroxiapatita, pode promover alterações do perfil inflamatório local.

As repercussões de fármacos que afetam o metabolismo ósseo como os antirreabsortivos, a exemplo dos BFs têm sido investigadas especialmente em modelos animais, nos quais se encontra redução do deslocamento dentário e menor número de osteoclastos observados após as colorações histológicas. Em relatos de caso se observa tempo mais longo de tratamento, espaço alargado do LP e alta mineralização óssea (JACOBS *et al.*, 2014). Ortega *et al.* (2012) relataram que a aplicação local de AZ conseguiu impedir o movimento dos dentes durante o fechamento dos espaços de extrações, além de prevenir a perda óssea.

Apesar dos impactos negativos na MDI, alguns autores relatam que os efeitos poderiam ser úteis para prevenir o deslocamento dentário com aplicações locais, definindo esta ação como “método farmacológico de ancoragem” (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2015; VENKATARAMANA *et al.*, 2014). Estudos demonstram que os BFs influenciam diretamente a faixa de movimentação pós terapia ortodôntica, reduzindo o número de recidivas, mas, acompanhamento a longo prazo são necessários de modo a verificar possíveis efeitos adversos dos BFs utilizados para este fim (IGLESIAS-LINARES *et al.*, 2010).

Em virtude do uso dos BFs por VO ou EV induzirem a formação de úlceras intestinais, ou no local de suas injeções, especula-se que o AZ apresente um efeito tóxico nas células da mucosa oral, podendo alterar fibroblastos e células epiteliais. Foi demonstrado que o efeito apoptótico do AZ nessas células ocorre primariamente ao desenvolvimento da OMB (SCHEPER *et al.*, 2009). Steller *et al.* (2019) sugeriram que o AZ impede a migração e proliferação celular dos osteoblastos, sendo este efeito estendido também aos fibroblastos humanos de maneira dose-dependente, reduzindo a produção de colágeno tipo I. Dessa forma, a adição de Fibrina rica em plaquetas nessas linhagens celulares, resultou na liberação de TGF- $\beta$  aumentando a produção de matriz extracelular e angiogênese. Modelos de co-cultura demonstraram a importância da interação entre células epiteliais e mesenquimais para a manutenção da homeostase e reparo dos tecidos orais, tendo o AZ um papel importante no retardo dessa cicatrização também por regular positivamente a síntese de quimiocinas (BASSO *et al.*, 2016).

Os BFs apresentam citotoxicidade em diferentes grupos celulares (JACOBS *et al.*, 2014; WALTER *et al.*, 2010), e apresentam afinidade por tecidos mineralizados como a dentina (CVICK *et al.*, 2011), mas, até o momento, pouco se sabe sobre a ação do AZ no tecido pulpar,

especialmente durante a MDI. Basso *et al.* (2013) sugeriram que determinadas condições clínicas, tais como o trauma dentário, poderia ativar os odontoclastos locais induzindo reabsorção na dentina e promovendo danos ao complexo dentino-pulpar. Cvik *et al.* (2011) sugerem a necessidade de estudos no sentido de verificar a hipótese de que, sob condições inflamatórias, as células pulpares tornem-se mais vulneráveis à ação do fármaco.

Dessa forma, o modelo experimental de MDI com ancoragem esquelética, utilizado neste estudo, foi associado a um protocolo crônico de infusões semanais do AZ, no intuito de avaliar além da taxa de MDI através do estudo de boca-dividida, a viabilidade do uso de DTA e as alterações promovidas na polpa e LP induzidas concomitantemente pelo uso do fármaco e pelo deslocamento dentário.

## 2 JUSTIFICATIVA

O envelhecimento populacional em curso de muitos países mudou o contexto epidemiológico das doenças, sendo as crônicas, a exemplo da osteoporose, mais prevalentes e influenciando o contexto da qualidade de vida dos seus portadores. No entanto, as mudanças na composição da população não se referem apenas à prevenção primária de doenças, e sim na melhora da sobrevida após o diagnóstico delas, resultando em um aumento crescente de pessoas com histórico de doenças anteriores.

Com o advento e acessibilidade dos implantes dentários, muitos pacientes apresentam a necessidade de adequação dos espaços protéticos para que uma reabilitação oral eficiente possa ser realizada, sendo fundamental o tratamento ortodôntico pré-protético. Logo, tornou-se comum encontrar pacientes adultos ou idosos realizando intervenções ortodônticas, o que aumenta a possibilidade desse tratamento ser afetado por comorbidades sistêmicas em virtude do uso contínuo de medicamentos, como os BFs, que alteram o metabolismo ósseo e promovem um contexto antagonico ao processo de reabsorção/aposição óssea necessário ao tratamento ortodôntico.

Dessa forma, ocasiões clínicas de traumatismo dentário ou o tratamento ortodôntico prévio à reabilitação oral citada anteriormente, envolvem mecânicas complexas em pacientes adultos, que podem ser beneficiados pelo uso dos MIs ortodônticos, reduzindo inclusive a necessidade de cooperação do paciente quando comparados aos métodos de ancoragem tradicionais. No entanto, como a inserção de um dispositivo de ancoragem envolve um trauma ósseo, faz-se necessário conhecer as alterações cicatriciais promovidas por um BF potente como o AZ, mediante a instalação do MI, visto que, procedimentos cirúrgicos devem ser evitados nesses pacientes pelo risco de desenvolvimento da osteonecrose.

Diante disso, de modo a fornecer possibilidades de tratamento para pacientes adultos que tratam algum comprometimento sistêmico com uso do AZ, e apresentarem necessidades ortodônticas estéticas e/ou funcionais, torna-se importante abordar sua influência tanto nos parâmetros macroscópicos e microscópicos da MDI, como na cicatrização óssea mediante o uso dos MI, visto que atuam como facilitadores das mecânicas ortodônticas atualmente.

### **3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS**

#### **3.1 Hipótese nula**

A utilização do AZ não interfere na MDI, permanecendo inalteradas as características inflamatórias e morfológicas do tecido ósseo dentário.

#### **3.2 Hipótese alternativa**

A utilização do AZ interfere na MDI alterando as características inflamatórias e morfológicas do tecido ósseo dentário.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Comparar os efeitos do AZ nas características inflamatórias e morfológicas do tecido ósseo dentário submetido a MDI em modelo experimental com ancoragem esquelética.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Realizar a mensuração da movimentação dentária através da comparação das distâncias resultantes da MDI em ambos os grupos;
- Avaliar as alterações histológicas nos tecidos ósseos e dentários no primeiro molar superior esquerdo, decorrentes da MDI nos diferentes grupos;
- Mensurar a distância microscópica de movimentação dentária entre o primeiro e o segundo molar superior esquerdo;
- Identificar a porcentagem de colágeno tipo I e tipo III dos lados movimentado e não movimentado;
- Avaliar o osso de suporte do mini-implante quanto às características histológicas inflamatórias e/ou cicatriciais.

## 5 CAPÍTULO

Esta dissertação está baseada no Artigo 46, do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para trabalhos de conclusão de mestrado e doutorado (dissertações e teses) e permite a inserção de artigos científicos de autoria do candidato.

Por se tratar de pesquisa envolvendo animais, o protocolo utilizado neste trabalho foi submetido à apreciação da Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) sendo aprovado e protocolado sob o nº CEUA 1595060619 (Anexo).

Desta forma, a presente dissertação é composta por um artigo científico redigido conforme a revista científica escolhida.

### 5.1 Capítulo 1

“Ácido zoledrônico inibe movimentação ortodôntica em modelo de rato com ancoragem esquelética e não altera parâmetros inflamatórios pulpare e periodontais” (*Zoledronic acid inhibits orthodontic movement in a rat model with skeletal anchorage and does not alter pulp and periodontal inflammatory parameters*).

Este artigo seguiu as normas de publicação do periódico: “Archives of Oral Biology” (ISSN 0003-9969).

## Title page

### **Zoledronic acid inhibits orthodontic movement in a rat model with skeletal anchorage and does not alter pulp and periodontal inflammatory parameters**

Priscila Macêdo França da Silva, DMD <sup>a,\*</sup>, Ilanna Mara Gomes Estanislau, MSc <sup>a</sup>, Thâmara Manoela Marinho Bezerra, PhD <sup>a</sup>, Vilana Andrade de Araújo, MSc <sup>a</sup>, Paulo Goberlânio de Barros Silva, PhD <sup>a,b,c</sup>, Ana Paula Negreiros Nunes Alves, PhD <sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Department of Dental Clinic, Division of Oral Pathology, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.*

<sup>b</sup> *Department of Dentistry, Unichristus, Fortaleza, Ceará, Brazil.*

<sup>c</sup> *Ceará Oncology School, Ceará Cancer Institute, Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará, Brazil.*

\*Corresponding author at: Department of Dental Clinic, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Monsenhor Furtado Street - Rodolfo Teófilo – Zip code: 60430-160, Fortaleza – CE, Brazil.

*E-mail address:* priscila.mfs@hotmail.com

Phone/Fax Number: +55 85 996885322

**Running title:** Zoledronic acid and orthodontic tooth movement with skeletal anchorage.

**Keywords:** Orthodontic anchorage procedure, bisphosphonates, zoledronic acid, osteonecrosis.

**Funding:** None.

**Conflict of Interest:** Authors declares that they have no conflict of interest. All authors have agreed to the submission.

### Abstract

**Objective:** Evaluating the effect of zoledronic acid (AZ) on the healing aspects of the mini-implant (MI) supporting bone tissue and inflammatory and morphological characteristics of bone-dental tissue subjected to induced tooth movement (MDI) in an experimental model with skeletal anchorage.

**Methods:** 48 male Wistar rats (350g) were divided into two experimental groups (n=6/group/day of euthanasia), and submitted to three intravenous administrations (IV) of AZ (0.2mg/kg) (GAZ) or 0.9% sterile saline solution (GC) (days 0, 7th and 14th). A closed CrNi spring was attached between the upper first molar left (1st MSE) and MI 28 days after the last IV administration (day 42nd). The animals were euthanized on days 49th, 56th, 63rd and 70th, corresponding to 7, 14, 21 and 28 days of MDI, respectively, being the upper first molar on both sides histologically evaluated for pulp and periodontal phenomena at each time of MDI. The resulting distances from the MDI were measured with the Zeiss® histological ruler and with a digital caliper, and it was verified the relation between collagen type I and III through the histochemistry of Picrosirius Red. The supporting bone tissue of the MI was evaluated regarding inflammatory and scarring parameters.

**Results:** Histological increase in tooth displacement in the CG on days 21st and 28th of MDI ( $p < 0,05$ ). There was no significant difference in the intensity of pulp and periodontal phenomena between groups and neither between MDI times ( $p > 0,05$ ). The presence of Malassez epithelial cells (CEM) was reduced in the GAZ on the side where there was no MDI, and in the CG, on the side where there was orthodontic activation over the days of movement ( $p < 0,05$ ). In GAZ, the relation between collagen type I and III was lower on day 14th ( $p < 0,05$ ), the number of empty osteocyte lacunae from the adjacent area to MI was higher on days 14th, 21st and 28th ( $p < 0,05$ ), with no significant correlation with the disposition of the inflammatory infiltrate ( $p > 0,05$ ), which became predominantly neutrophilic by day 28th ( $p < 0,05$ ).

**Conclusion:** AZ reduced tooth displacement, not interfering directly with the pulp and periodontal tissue, but reducing the percentage of CEM when there was no MDI. The drug administration did not change the repair process provided by the collagen fibers of the LP, but modified the healing parameters of the bone tissue of MI support, probably in association with the trauma of DTA installation, without characterizing osteonecrosis.

**Keywords:** Orthodontic anchorage procedures, bisphosphonates, acid zoledronic, osteonecrosis.

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar o efeito do Ácido zoledrônico (AZ) nos aspectos cicatriciais do tecido ósseo de suporte do mini-implante (MI) e nas características inflamatórias e morfológicas do tecido ósseodentário submetido à movimentação dentária induzida (MDI) em modelo experimental com ancoragem esquelética.

**Métodos:** 48 ratos *Wistar* machos (350g) foram divididos em dois grupos experimentais (n=6/grupo/dia de eutanásia), e submetidos a três administrações endovenosas (EV) do AZ (0,2mg/kg) (GAZ) ou da solução salina estéril 0,9% (GC) (dias 0, 7 e 14). Uma mola fechada de CrNi foi fixada entre o primeiro molar superior esquerdo (1<sup>o</sup>MSE) e o MI 28 dias após a última administração EV (dia 42). Os animais foram eutanasiados nos dias 49, 56, 63 e 70, correspondendo a 7, 14, 21 e 28 dias de MDI, respectivamente, sendo o primeiro molar superior dos dois lados histologicamente avaliado quanto aos fenômenos pulpares e periodontais em cada tempo de MDI. As distâncias resultantes da MDI foram mensuradas com a régua histológica Zeiss® e com um paquímetro digital, e ainda verificou-se a relação entre o colágeno tipo I e III através da histoquímica de Picrosirius Red. O tecido ósseo de suporte do MI foi avaliado quanto aos parâmetros inflamatórios e cicatriciais.

**Resultados:** Aumento histológico do deslocamento dentário no GC nos dias 21 e 28 de MDI (p<0,05). Não houve diferença significativa na intensidade dos fenômenos pulpares e periodontais entre os grupos e nem entre os tempos de MDI (p>0,05). A presença das células epiteliais de Malassez (CEM) foi reduzindo no GAZ no lado em que não houve MDI, e no GC, no lado em que houve ativação ortodôntica ao longo dos dias de movimentação (p<0,05). No GAZ a relação entre colágeno tipo I e III foi menor no dia 14 (p<0,05), o número das lacunas de osteócitos vazias da área adjacente ao MI foi maior nos dias 14, 21 e 28 (p<0,05), sem correlação significativa com a disposição do infiltrado inflamatório (p>0,05), que tornou-se, predominantemente neutrofílico no dia 28 (p<0,05).

**Conclusão:** o AZ reduziu o deslocamento dentário, não interferindo no tecido pulpar e periodontal de forma direta, e sim na redução do percentual das CEM quando não houve MDI. A administração do fármaco não alterou o processo de reparo proporcionado pelas fibras colágenas do LP, mas modificou os parâmetros cicatriciais do tecido ósseo de suporte do MI, provavelmente, em associação ao trauma da instalação do DTA, sem caracterizar quadro de osteonecrose.

**Palavras-chaves:** Procedimentos de ancoragem ortodôntica, bisfosfonatos, ácido zoledrônico, osteonecrose.

## 1. Introdução

Os avanços terapêuticos possibilitam um melhor contexto de qualidade de vida em pacientes portadores de doenças ósseas benignas ou malignas. Esses pacientes adultos podem ser beneficiados pelo tratamento ortodôntico em uma situação de traumatismo dentário ou previamente realizado aos procedimentos de reabilitação oral, apesar desses casos muitas vezes, envolver mecânicas ortodônticas complexas (DAI *et al.*, 2017; RUSSOW *et al.*, 2019).

O ácido zoledrônico (AZ), utilizado no tratamento da osteoporose e metástases ósseas, trata-se de um BFsN de última geração, que controla a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos através do bloqueio da via do mevalonato, promovendo a inibição da prenilação de proteínas de sinalização envolvidas no crescimento e diferenciação celular, contribuindo assim, para o desenvolvimento da osteonecrose e tornando comprometido o prognóstico de procedimentos que dependam do processo de neoformação e cicatrização óssea (DIONÍSIO *et al.*, 2019). Estudos recentes apresentam suas propriedades antiangiogênicas, além da contribuição para reduzir a proliferação de células tumorais, aumentando a sobrevida global de pacientes com câncer de mama (LIU *et al.*, 2019).

A movimentação dentária induzida (MDI) tem a remodelação óssea como seu aspecto primordial e induz modificações microscópicas na polpa e ligamento periodontal (LP) (RANGIANI *et al.*, 2016), sendo a ancoragem esquelética conferida pelos mini-implantes (MIs), importante auxiliar da prática ortodôntica atual (ALMEIDA, 2019). A taxa de deslocamento dentário pode variar por fatores locais ou sistêmicos, como a duração da força aplicada, resposta biológica do LP, idade, e também pelo potencial farmacológico de alguns medicamentos (KRISHNAN *et al.*, 2015; VENKATARAMANA *et al.*, 2014). A atividade osteoclástica foi reduzida em animais submetidos a MDI que receberam administração de AZ, e os efeitos deletérios deste fármaco foram demonstrados na cicatrização óssea e no comprometimento do movimento dentário (FRANZONI *et al.*, 2017).

O tratamento ortodôntico de pacientes adultos pode envolver a correção de discrepâncias esqueléticas transversais, a adequação dos espaços protéticos, ou outras necessidades, as quais podem ser facilitadas com o uso dos MIs como alternativa aos métodos tradicionais de ancoragem, que, em determinados casos, não são suficientes e geram efeitos indesejáveis resultantes da aplicação dos sistemas de força, aumentando assim, o tempo de tratamento (LEO *et al.*, 2016). Esses dispositivos podem ser facilmente inseridos ou removidos do tecido ósseo e a estabilidade obtida após a sua inserção, atua como ponto crítico da técnica, variando principalmente conforme a densidade óssea local e a presença de inflamação (CHOI

*et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2019). No entanto, não é bem definido se a cicatrização óssea e estabilidade necessária ao uso dos MIs aconteceria apesar da utilização prévia de um potente BF como o AZ, visto que um trauma ósseo para inserção do dispositivo é necessário, e procedimentos cirúrgicos atuam como fator de risco ao desenvolvimento da osteonecrose em pacientes usuários desse fármaco (HUJA *et al.*, 2011). Dessa forma, este estudo se propõe a investigar os efeitos do AZ nas características inflamatórias e morfológicas do tecido ósseo submetido a MDI, além dos aspectos cicatriciais no tecido ósseo de suporte do dispositivo de ancoragem, utilizando um modelo experimental em ratos onde um MI ortodôntico atua como ponto de ancoragem da movimentação.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Animais, grupos e doses**

Após aprovação pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) (protocolo n°:1595060619), 48 ratos machos da linhagem *Wistar (Ratos norvegicus)* foram utilizados neste estudo. Os animais pesando cerca de 350g cada, tiveram acesso à água e ração balanceada própria *ad libitum*, e ciclo de claro/escuro de 12h com temperatura de 24°C. Após o início da MDI, os animais receberam a mesma ração, porém triturada durante as primeiras 48 horas para que os mesmos realizassem menor esforço mastigatório.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos principais e 4 subgrupos conforme o tempo total de MDI, contendo 6 animais cada. Os grupos principais receberam três injeções endovenosas (EV) consecutivas de solução salina 0,1 ml/kg no grupo controle (GC), e de AZ (Eurofarma®) na concentração de 0,2 mg/kg, no grupo teste (GAZ) (SILVA *et al.*, 2015). Todos os animais tiveram seus primeiros molares superiores esquerdos (1°MSEs) submetidos a MDI e o lado contralateral não recebeu força ortodôntica, atuando como controle interno. As injeções semanais do AZ ou da solução salina ocorreram nos dias 0, 7 e 14, previamente ao início da MDI. Após 28 dias da última dose (dia 42) (SILVA *et al.*, 2015), os dispositivos ortodônticos foram instalados (Figura 02).

## **2.2. Protocolo experimental**

O design experimental de MDI utilizou uma mola fechada de Níquel-Cromo (CrNi) de 6 mm (Morelli®, Sorocaba, SP) posicionada entre o 1ºMSE (ponto de aplicação da força) e o MI (ponto de ancoragem). Distendendo-se a mola, uma calibração de força inicial de 50gF foi padronizada para todos os grupos através de um dinamômetro ortodôntico (Morelli®, Sorocaba, SP). Antes da instalação do aparelho, os animais foram anestesiados via intraperitoneal, com a combinação de Quetamina 80mg/Kg e Xilazina 10mg/Kg. Foram utilizados dispositivos temporários de ancoragem (DTA) do tipo auto perfurantes, sem perfil transmucoso, apresentando 1,4 x 6,0 mm (Sin®), e instalados com auxílio de uma chave de mão (Sin®) a uma distância de cerca de 2 mm da região distal do incisivo superior direito. O uso do lado contralateral objetivou a obtenção de uma maior distância do molar ao incisivo, e, conseqüentemente, uma maior força de ativação da mola (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2015).

Os DTA receberam carga imediata e antes de incorporar força ao mesmo, sua estabilidade primária foi conferida (KAIPATUR *et al.*, 2014). Para ativar a mecânica de movimentação do 1ºMSE, uma ligadura em aço inoxidável 0,020” (Morelli®) foi instalada abaixo da sua ameia distal no sentido de lingual para vestibular, com o auxílio de uma portagulha Mathieu (Golgran®). Esse fio circundou toda a região cervical do dente, fixando-o a uma das extremidades da mola, e em seguida, trefilado. A porção livre da mola também recebeu uma porção de ligadura metálica que passou no orifício situado na cabeça do MI, sendo ali, trefilada (Figura 03).

Nas semanas seguintes (dias 49, 56, 63 e 70), os animais foram eutanasiados totalizando 07, 14, 21 e 28 dias de MDI em cada subgrupo. A maxila dos animais e o tecido ósseo de suporte do MI foram coletados para análises microscópicas.

## **2.3. Mensuração da movimentação dentária**

A mensuração da movimentação dentária foi realizada através da comparação das distâncias obtidas com a MDI, por um único operador previamente treinado e de forma cega, através de um paquímetro digital, semelhante ao método utilizado por Brunet *et al.*, (2016). Foram medidas as distâncias entre a face mesial do 1º MSE e o MI da região contralateral (medida A), distância desse elemento dentário a face mesial do incisivo superior esquerdo (medida B), e a distância entre a face mesial do incisivo superior direito e o MI (medida C),

antes da ativação dos DTA e imediatamente após a eutanásia dos animais, de ambos os grupos. Essas medidas foram consideradas em conjunto pois formaram um triângulo irregular cuja área foi calculada com o objetivo de mensurar a movimentação do 1ºMSE que pode ocorrer de forma não linear (Figura 04).

#### **2.4. Análise histológica**

As hemimaxilas e o tecido ósseo de instalação do MI foram descalcificados em solução de EDTA 10% (pH 7,3) durante 30 dias para posterior processamento histológico em histotécnico automatizado LUPE® e subsequentes etapas de inclusão, microtomia e coloração por hematoxilina-eosina (HE) e Picosirius red (ScyTek®) (ALVES *et al.*, 2018).

#### **2.5. Histoquímica por Hematoxilina-eosina**

As análises microscópicas dos cortes corados em HE ocorreram em microscópio óptico Olympus® CX41 e o espaço decorrente da movimentação dentária compreendido entre o primeiro e o segundo molar superior esquerdo (2ºMSE), foi mensurado através de uma régua histológica (Zeiss®) calibrada com 1 mm e ajustada ao microscópio em pequeno aumento (40x). Além disso, os 1ºMSEs (lado movimentado) e os primeiros molares superiores direitos (1ºMSDs) (lado não movimentado) foram examinados para diagnosticar seus estados pulpar e periodontal conforme os parâmetros descritos a seguir. A presença das células epiteliais de Malassez (CEM) também foi documentada (ESTANISLAU, 2019).

#### **2.6. Fenômenos pulpares**

Foram avaliados a desorganização da camada odontoblástica, vacuolização celular, edema, congestão vascular, hemorragia e infiltrado inflamatório (leucocitário com neutrófilos polimorfonucleares e mononucleares), e atribuídos escores segundo a intensidade dos achados, sendo eles: **0**: sem alterações pulpares (organização da camada de odontoblastos, formação de pré-dentina, congestão vascular ocasional, presença de células fusiformes). **1**: desorganização da camada de odontoblastos, vacuolização celular, discreta congestão vascular, leve edema. **2**: desorganização da camada de odontoblastos, vacuolização celular, moderado edema, moderada congestão vascular, hemorragia, presença de discreto a moderado infiltrado inflamatório. **3**: desorganização da camada de odontoblastos, vacuolização celular, moderada a intensa

congestão vascular, intenso edema, presença de intenso infiltrado inflamatório (ESTANISLAU, 2019).

### ***2.7. Fenômenos periodontais***

Foram analisados os achados de congestão vascular, presença/ausência de hemorragia, infiltrado inflamatório neutrofílico e/ou mononuclear, reabsorção óssea com ou sem visualização de osteoclastos, hialinização do ligamento periodontal e reabsorção dentinária e/ou cementária, e conforme a intensidade desses fenômenos foram atribuídos escores, sendo eles: **0:** ausência de alterações periodontais (fibras colágenas íntegras, crista óssea preservada, ocasionais vasos ectásicos, epitélio juncional constituído por poucas camadas celulares). **1:** migração e discreta hiperplasia do epitélio juncional, presença de discreto infiltrado de células mononucleares, preservação parcial e superficial das fibras colágenas, reabsorção parcial da crista óssea, ocasionais vasos ectásicos. **2:** migração e hiperplasia do epitélio juncional, presença de discreto a moderado infiltrado neutrofílico e de células mononucleares, destruição parcial das fibras colágenas, hialinização do ligamento periodontal, reabsorção óssea com ou sem visualização de osteoclastos, vasos ectásicos. **3:** migração e hiperplasia do epitélio juncional, presença de moderado a intenso infiltrado neutrofílico e de células mononucleares, destruição das fibras colágenas, hialinização do ligamento periodontal, reabsorção óssea com ou sem visualização de osteoclastos, vasos ectásicos, hemorragia, reabsorção dentinária e/ou cementária (ESTANISLAU, 2019).

### ***2.8. Histoquímica por Picrosirius Red***

Para quantificar os tipos de colágeno, um campo microscópico no aumento de 100x na região do LP entre o 1º e 2º molar superior do lado submetido e não submetido a MDI foi selecionado e fotografado com auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio, analisadas através do Software Image J® em uma função específica para o vermelho, verde e azul. As imagens foram convertidas para uma escala de cor de 8 bits e binarizadas, sendo medida a porcentagem de área de colágeno corado em vermelho. O mesmo protocolo foi utilizado após polarização da luz para mensurar a porcentagem de área com colágeno Tipo I (birrefringência amarelo-avermelhado). A área de colágeno Tipo III (birrefringência verde-esbranquiçado), foi medida após subtração da porcentagem de área corada em vermelho-amarelada pela área corada em vermelho (ALVES *et al.*, 2018).

## ***2.9. Análise do tecido ósseo de suporte do mini-implante***

O tecido de suporte do MI foi avaliado quanto à presença de sinais histológicos de necrose óssea, bem como análise quantitativa e qualitativa do infiltrado inflamatório polimorfo, mononuclear ou misto. Para isso, foram fotografados 3 campos no aumento de 400x para contagem diferencial de lacunas de osteócitos vazias no tecido ósseo adjacente e distante da área de inserção do MI (SILVA *et al.*, 2015; TEÓFILO *et al.*, 2020).

## ***2.10. Análise estatística***

Os escores histológicos foram expressos em forma de mediana (mínima – máxima) e analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. As comparações entre os grupos em cada período da MDI foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. Os dados foram expressos em forma de média e erro-padrão da média e comparados utilizando o teste ANOVA-1-way seguido do pós-teste de Bonferroni utilizando o GraphPad Prism® 5,0 ( $p < 0,05$ ).

## **3. Resultados**

### ***3.1. Mensuração da movimentação dentária induzida***

#### ***3.1.1 Mensuração macroscópica***

##### ***3.1.1.1 Distância entre o 1ºMSE e o MI (Medida A)***

A análise macroscópica mostrou significância estatística ( $p=0,029$ ) entre o GC ( $-1,98 \pm 0,2$ ) e o GAZ ( $-1,1 \pm 0,2$ ) com 28 dias de ativação ortodôntica. No dia 21 também observou-se um maior deslocamento dentário mesial no GC em relação ao GAZ, não apresentando diferença estatística ( $p=0,405$ ). Não houve variação significativa dessa medida entre os grupos nos dias 7 ( $p=0,899$ ) e 14 ( $p=0,588$ ).

### **3.1.1.2 Distância entre o 1ºMSE e o Incisivo superior esquerdo (Medida B)**

Em relação à medida B, não houve diferença estatisticamente significativa da variação da distância entre o 1ºMSE e a face mesial do Incisivo superior esquerdo nos dias 7 ( $p=0,384$ ), 14 ( $p=0,056$ ), 21 ( $p=0,272$ ) e 28 ( $p=0,955$ ) nos dois grupos experimentais.

### **3.1.1.3. Distância entre o Incisivo superior direito e o MI (Medida C)**

Similarmente à medida B, não foi observada diferença estatística significativa na variação da distância entre a face mesial do Incisivo superior direito e o MI (medida C) nos dias 7 ( $p=0,724$ ), 14 ( $p=0,721$ ), 21 ( $p=0,436$ ) e 28 ( $p=0,074$ ) em ambos os grupos.

### **3.1.1.4. Área de triângulos irregulares**

Foi observada que a variação da área do triângulo formado pelas medidas A, B e C reduziu no GC com 21 dias de movimentação ortodôntica ( $-0,25\pm 0,06$ ) em relação ao GAZ ( $-0,08\pm 0,02$ ), apresentando significância estatística ( $p=0,031$ ). Uma diferença significativa também foi encontrada no dia 28 quando o GC obteve variação de ( $-0,27\pm 0,04$ ) e o GAZ ( $-0,13\pm 0,03$ ) ( $p=0,013$ ). Não se visualizou variação significativa da área entre os grupos nos dias 7 ( $p=0,159$ ) e 14 ( $p=0,35$ ).

### **3.1.2. Mensuração microscópica**

A análise microscópica mostrou que o 1º MSE já apresentou deslocamento com 7 dias de indução ortodôntica em ambos os grupos. Ao longo do curso temporal de movimentação dentária, o GC mostrou uma quantidade de MDI superior ao GAZ, que permaneceu com o deslocamento estável mesmo com tempos superiores de ativação ortodôntica. No dia 21 valores significativamente maiores de MDI foram observados no GC ( $27,4\pm 2,9$ ), em relação ao GAZ ( $16,5\pm 1,7$ ) ( $p=0,021$ ), assim como no dia 28, no qual se verificaram valores de ( $27,0\pm 3,8$ ) e ( $17,1\pm 1,4$ ) ( $p=0,028$ ) no GC e GAZ, respectivamente (Figuras 5, 12 - A, B, C, D e 12 - I, J, K, L).

## **3.2 Análise histológica**

### **3.2.1. Fenômenos pulpaes**

A análise da intensidade dos achados pulpaes mostrou ausência de alterações no lado contralateral em que não houve MDI (Figura 9), sem diferença estatisticamente significativa entre o GC e o GAZ nos dias 7 ( $p=0,914$ ), 14 ( $p=0,476$ ), 21 ( $p=0,556$ ) e 28 ( $p=0,699$ ). O mesmo ocorreu no lado movimentado (Figura 10), no qual não foi observada diferença significativa entre os dois grupos nos dias 7 ( $p=1,000$ ), 14 ( $p=0,914$ ), 21 ( $p=0,556$ ) e 28 ( $p=0,818$ ). O aumento do tempo de MDI não comprometeu a integridade pulpar no GC ( $p=0,495$ ) e no GAZ ( $p=0,928$ ) (Tabela 3).

### **3.2.2. Fenômenos periodontais**

Não foram encontrados fenômenos celulares e periodontais decorrentes da MDI no lado não movimentado (Figura 11), sem diferença estatisticamente significativa entre GC e o GAZ nos dias 7 ( $p=0,690$ ), 14 ( $p=0,762$ ), 21 ( $p=1,000$ ) e 28 ( $p=1,000$ ). O lado em que ocorreu a MDI apresentou o escore máximo de alterações periodontais (Figura 12), entretanto, não houve diferença estatística entre os dois grupos nos dias 7 ( $p=1,000$ ), 14 ( $p=0,610$ ), 21 ( $p=0,730$ ) e 28 ( $p=1,000$ ). O tempo de ativação ortodôntica não influenciou na intensidade dos achados periodontais no GC ( $p=0,334$ ) quando comparado ao GAZ ( $p=0,290$ ) (Tabela 3).

### **3.2.3. Células epiteliais de Malassez**

No lado que ocorreu a MDI observou-se que o tempo de indução influenciou significativamente as CEM no GC ( $p=0,005$ ), visto que se mostraram mais presentes nos dias iniciais de movimentação, reduzindo ao longo do período. Já no GAZ, o tempo de ativação ortodôntica não promoveu diferença estatística na redução das células epiteliais ( $p=0,699$ ). A presença dessas células não foi estatisticamente significativa quando se comparou o GC e GAZ nos dias 7 ( $p=0,197$ ), 14 ( $p=1,000$ ), 21 ( $p=0,635$ ) e 28 ( $p=1,000$ ) (Tabela 3).

Em relação ao lado em que não houve MDI, no GAZ observou-se redução significativa ao longo do período analisado ( $p=0,045$ ), e no dia 7, uma maior presença dessas células. No GC não foi encontrada diferença estatística entre os dias experimentais ( $p=0,950$ ), mas uma maior presença dessas células epiteliais ocorreu no dia 7, tornando-se ausente nos dias 21 e 28.

Não foi encontrada diferença significativa na presença das CEM entre o GC e o GAZ nos dias 7 ( $p=1,000$ ), 14 ( $p=0,500$ ), 21 ( $p=0,444$ ) e 28 ( $p=0,455$ ) (Tabela 3).

#### ***3.2.4. Porcentagem de Colágeno Total***

Não houve diferença significativa da porcentagem de colágeno total no lado em que não houve MDI entre o GC e o GAZ nos dias 7 ( $p=0,472$ ), 14 ( $p=0,943$ ), 21 ( $p=0,863$ ) e 28 ( $p=0,156$ ) (Figuras 06-A e 13). Da mesma maneira, no lado movimentado, a MDI não representou diferença estatística significativa na porcentagem de colágeno total entre os dois grupos nos dias 7 ( $p=0,448$ ), 14 ( $p=0,184$ ), 21 ( $p=0,431$ ) e 28 ( $p=0,793$ ) (Figuras 06-B e 14).

#### ***3.2.5. Relação entre Colágeno Tipo I e Tipo III***

Não houve diferença significativa do percentual da relação entre colágeno tipo I e III no lado em que não houve MDI entre o GC e o GAZ nos dias 7 ( $p=0,957$ ), 14 ( $p=0,213$ ), 21 ( $p=0,649$ ) e 28 ( $p=0,190$ ) (Figuras 07-A e 13). No entanto, com a indução ortodôntica, foi observada uma diminuição significativa da porcentagem dessa relação no GAZ ( $0,10\pm 0,05$ ) em comparação ao GC ( $1,11\pm 0,13$ ) ( $p=0,0005$ ) com 14 dias de movimentação. Não houve diferença estatisticamente significativa no percentual da razão entre colágeno tipo I e III entre os dois grupos nos dias 7 ( $p=0,621$ ), 21 ( $p=0,792$ ) e 28 ( $p=0,871$ ) (Figuras 7-B e 14).

### ***3.3. Análise do tecido ósseo de suporte do mini-implante***

#### ***3.3.1. Lacunas de osteócitos vazias no osso adjacente ao MI***

Com 14 dias de indução ortodôntica houve aumento significativo do percentual de lacunas de osteócitos vazias no osso adjacente à área de instalação do MI no GAZ ( $22,35\pm 1,38$ ) em relação ao GC ( $14,67\pm 2,81$ ) ( $p=0,047$ ). Observou-se continuidade do percentual superior significativo de lacunas vazias nos dias 21 e 28 de MDI, apresentando  $p=0,006$  e  $p=0,01$ , respectivamente (Figuras 8-A e 15).

### ***3.3.2. Lacunas de osteócitos vazias no osso distante do MI***

Houve aumento significativo do percentual de lacunas de osteócitos vazias no tecido ósseo distante da região de instalação do MI, com 21 dias de MDI no GAZ ( $19,68 \pm 2,25$ ) em comparação ao GC ( $12,90 \pm 1,25$ ) ( $p=0,02$ ). No dia 28 as lacunas vazias atingiram um percentual ainda maior no GAZ ( $25,47 \pm 2,2$ ) em relação ao GC ( $15,68 \pm 1,88$ ) com diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,008$ ) (Figuras 8-B e 16).

### ***3.3.3. Intensidade do infiltrado inflamatório***

A análise microscópica para avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório na região do osso de suporte do MI não revelou diferença estatística significativa entre o GC e o GAZ nos dias 7 ( $p=0,310$ ), 14 ( $p=0,914$ ), 21 ( $p=0,556$ ) e 28 ( $p=0,589$ ). No entanto, um infiltrado inflamatório moderado no GAZ nos dias 7 e 21 de MDI foi visualizado, enquanto, que no GC, em ambos os dias, a inflamação apresentou intensidade leve. O tempo de indução ortodôntica não influenciou significativamente na intensidade do infiltrado inflamatório no GC ( $p=0,428$ ) e no GAZ ( $p=0,613$ ) (Tabela 2).

### ***3.3.4. Disposição do infiltrado inflamatório***

Com 7 e 28 dias de MDI observa-se uma diferença significativa da disposição do infiltrado inflamatório entre o GC e GAZ ( $p=0,034$ ), mostrando-se difuso no GAZ na totalidade da amostra e em ambos os dias supracitados. O tempo de indução do deslocamento dentário, não influenciou significativamente a disposição do infiltrado inflamatório no GC ( $p=0,408$ ) e no GAZ ( $p=0,151$ ) (Tabela 2).

### ***3.3.5. Tipo de infiltrado inflamatório***

O tempo de MDI influenciou significativamente o tipo de infiltrado inflamatório no GAZ tornando-se polimorfonuclear (PMN) ao longo do período analisado ( $p=0,032$ ), enquanto no GC, houve uma tendência de cronificação do processo inflamatório sem significância estatística entre os dias experimentais ( $p=0,346$ ). Não houve diferença estatisticamente

significante no tipo de infiltrado inflamatório entre o GC e o GAZ nos dias 7 ( $p=1,000$ ), 14 ( $p=0,240$ ), 21 ( $p=0,353$ ) e 28 ( $p=0,096$ ) (Tabela 2).

### ***3.3.6 Análise da correlação entre o percentual das lacunas de osteócitos vazias e a disposição do infiltrado inflamatório no osso adjacente ao MI***

Não foi observada correlação significativa entre o percentual de lacunas de osteócitos vazias e a disposição do infiltrado inflamatório no tecido ósseo adjacente a área de inserção do MI ( $p=0,638$ ).

### ***3.3.7 Análise da correlação entre o percentual das lacunas de osteócitos vazias e a disposição do infiltrado inflamatório no osso distante do MI***

Não foi observada correlação significativa entre o percentual de lacunas de osteócitos vazias e a disposição do infiltrado inflamatório no tecido ósseo distante da área de inserção do MI ( $p=0,571$ ).

## **4. Discussão**

A dose e o protocolo de administração do AZ utilizados no presente estudo foram documentados por Silva *et al.* (2015) que mostraram alterações histológicas e inflamatórias promovendo a conversão farmacológica da dose de AZ em humanos para animais em um modelo de indução da osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos (OMB).

Na presente pesquisa, os resultados macroscópicos da MDI demonstram que houve um deslocamento mesial do 1ºMSE em direção ao MI e não ao incisivo superior esquerdo (ISE), o que conseqüentemente, promoveu redução significativa da área formada pelas medidas A, B e C nos dias 21 e 28. Esses dados são sustentados tanto pela ausência de variação significativa da medida B entre os dias analisados, como pela medida A, que apesar de termos variação significativa entre os grupos apenas no dia 28, mostrou deslocamento mesial maior no GC já a partir do dia 21. Nos dias 7 e 14 a MDI representada pela medida A, ocorreu no GAZ de forma similar ao GC e esse resultado pôde ser visto também por Brunet *et al.* (2016) quando não houve diferença estatística em 3, 7 e 14 dias de movimentação apesar da administração de AZ.

A ausência de variação da medida B entre os grupos avaliados sugere que houve uma giroversão do 1ºMSE com sua cúspide méso-vestibular deslocando na direção palatina durante

a movimentação, o que pode ser justificado pelo tracionamento ter sido realizado pelo lado contralateral, desfavorecendo a direção do movimento no sentido do ISE, e conseqüentemente inalterando essa medida. Além disso, sabe-se que o ponto de aplicação da força na coroa do dente e assim distante do centro de resistência (CR) do mesmo, que estaria localizado a uma altura média de 1/3 da raiz dentária, promove um momento de inclinação, gerando um movimento que não é de corpo (KONDO *et al.*, 2017), e que, no presente protocolo, resultou no momento de giro do 1ºMSE. Vale ressaltar, que o momento produzido varia conforme a distância do CR ao ponto de aplicação da força e a magnitude de força utilizada, verificado por Kondo *et al.* (2017) um deslocamento maior do CR com forças entre 50 e 100cN.

Com a avaliação da medida C verificaram-se deslocamentos do MI durante a MDI sendo observada uma uniformidade das distâncias entre os grupos experimentais durante o período analisado, sugerindo que a força aplicada (50gF) não representou um fator preponderante para promover mudança de posicionamento no dispositivo de ancoragem mesmo tendo sido levemente superior a de 30g utilizada por Kaipatur *et al.* (2014), quando compararam a taxa de deslocamento do MI com 4 e 8 semanas de movimentação, não encontrando diferença estatística no 28º dia.

Quanto à quantidade de força aplicada para o deslocamento dentário, foi encontrada divergência entre os protocolos experimentais de ancoragem esquelética e utilizou-se uma força já validada por outros estudos de MDI passível de obter uma protração significativa do molar (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2016; SOUSA *et al.*, 2021). A comparação de diferentes tipos de movimentos e magnitudes de forças em ratos durante 21 dias de MDI mostrou que forças excessivas como a de 100g podem reduzir a movimentação, e o deslocamento dentário de corpo aumentou gradualmente com o uso de 25 e 50g de força (NAKANO *et al.*, 2014), corroborando os achados do presente estudo.

Algumas variáveis clínicas que poderiam ser apontadas como determinantes do sucesso da estabilidade dos DTA tais como, o comprimento e diâmetro do parafuso, quantidade e duração da força aplicada, além da presença de inflamação e mobilidade, dentre outras, foram analisadas por Park *et al.* (2006) e Wu *et al.* (2009). Estes autores não encontraram falhas clínicas associadas ao comprimento e diâmetro dos dispositivos. Entretanto, considerou-se o uso de um MI de 6mm de comprimento, um importante fator de estabilidade no presente estudo, visto que, foi aplicada carga imediata em osso de baixa densidade na maxila do animal, e um maior comprimento e diâmetro proporcionaram uma melhor superfície de contato osso-MI, aumentando o travamento mecânico entre eles. Vale ressaltar a necessidade do cuidado em relação à inserção de MIs mais longos pelo risco de perfuração nasal nos animais, que pode

ocasionar morte prematura (GUDHIMELLA *et al.*, 2018). Foi demonstrado a falha dos DTA que foram adaptados em osso pouco denso, sugerindo que a espessura óssea trabecular é determinante para os procedimentos de ancoragem (GABET *et al.*, 2010).

Outro estudo da estabilidade dos DTA que comparou ratos *Wistar* jovens e adultos submetidos a uma tração ortodôntica de 2-N durante 2 semanas, mostrou uma mobilidade maior em animais jovens do que nos adultos que receberam carga imediata (YANO *et al.*, 2014). Logo, a maturação óssea encontrada em ratos de maior idade pode explicar a ausência de variação significativa da medida C entre os grupos, mediante a aplicação de força imediata.

Visualizou-se um infiltrado inflamatório de intensidade leve no tecido conjuntivo associado a região óssea de instalação do MI em praticamente todos os dias experimentais, sem diferença estatística entre os grupos analisados, o que contribuiu possivelmente para evitar uma perda óssea significativa que interferisse na estabilidade do dispositivo tanto no GAZ como no GC. A importância desse dado foi analisada por um estudo retrospectivo onde duas variáveis foram estatisticamente significantes para aumentar as taxas de falhas em MIs: inflamação local moderada a severa e a carga aplicada em um período de até 3 semanas (CHEN *et al.*, 2008).

A ausência de diferença significativa da medida C entre os grupos e a intensidade do infiltrado inflamatório, mostram que o AZ não comprometeu a estabilidade primária do MI e não foi atingida a estabilidade secundária, considerando que ela ocorreria cerca de um mês após a instalação dos dispositivos (KAIPATUR *et al.*, 2014). Em modelo de indução de osteonecrose pós exodontia, a dose de 0,2mg/kg de AZ mostrou na análise microscópica do osso mandibular um intenso infiltrado inflamatório neutrofílico (SILVA *et al.*, 2015). Acredita-se que o trauma gerado pela inserção de um MI do tipo auto-perfurante não foi suficiente para gerar uma reação inflamatória intensa. O infiltrado inflamatório difuso nos dias 7 e 28 de MDI no GAZ demonstra que houve uma inflamação farmacológica associada a força localmente aplicada para tração dentária.

Em relação ao tipo de infiltrado inflamatório observou-se que ambos os grupos tendem a mostrar uma inflamação mista sem a preponderância de neutrófilos nos dias iniciais de MDI. No entanto, no GAZ o infiltrado neutrofílico perdura por mais tempo, apesar da força aplicada para produzir o movimento dentário ser naturalmente diluída. Tal fato é compatível com o estudo de Silva *et al.* (2016) que analisaram as alterações celulares promovidas pelo AZ e verificaram aumento no número de neutrófilos PMN nos grupos tratados com uma dose de 0,20 ou 1,0 mg/kg de AZ. Foi demonstrado por Norton *et al.* (2012) em um modelo murino de peritonite, que o efeito pró-inflamatório do Alendronato, Zoledronato e Pamidronato está relacionado a um aumento de neutrófilos seguido de grande influxo de monócitos. O pico de

neutrófilos foi associado ao aumento nos níveis de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  induzida por BFsN que podem atingir níveis locais elevados no osso e promover um grande recrutamento neutrofilico.

Verificou-se o tecido ósseo de suporte do MI também em relação a presença de necrose óssea e para comparação entre os grupos foi utilizado um índice de viabilidade dos osteócitos conforme relatado por Huja *et al.* (2011). Um tecido anofílico, desorganizado e com osteócitos volumosos foi encontrado adjacente à região onde foi promovido o defeito ósseo, sugerindo assim, uma área de remodelação. Sabe-se que sinais histopatológicos compatíveis com Osteonecrose dos maxilares induzida por Bisfosfonatos (OMB) estão relacionados a trabéculas de tecido ósseo com lacunas vazias de osteócitos, osteoclastos volumosos com hiper Cromatismo nuclear e vacuolização intra-citoplasmática, além dos espaços intertrabeculares infiltrado por células inflamatórias como os neutrófilos, dentre outros (MÜCKE *et al.*, 2016).

Ao longo do período analisado, na região adjacente a área de inserção do MI, ocorreu um processo de reparo no GC pela redução das lacunas de osteócitos vazias, contrapondo-se ao GAZ que aumenta o seu percentual significativamente a partir do 14º dia. Esse achado sugere início de dano ao tecido ósseo, mas não foram visualizados osteoclastos e nem infiltrado inflamatório nestas áreas. A ausência de correlação significativa desse dado com a disposição do infiltrado inflamatório sugere que o AZ suprimiu a cicatrização, mas, a lesão óssea promovida pelo MI não configurou uma osteonecrose nessa área. Um tempo maior de avaliação do efeito do AZ foi sugerido por Huja *et al.* (2011) quando avaliaram a consolidação óssea no local de inserção do MI em cães após a administração de 0,1mg/kg/mês de AZ durante 4 meses. Esses autores relataram que apesar de a renovação óssea ser menor nos animais tratados com AZ, nenhuma lesão exposta semelhante a osteonecrose foi verificada, validando o presente resultado.

Ainda no tecido ósseo de suporte do MI, mas na área distante de onde ocorreu o defeito ósseo, foram observadas trabéculas bem organizadas e menor quantidade de osteócitos, como uma área de osso maduro. No GAZ verificaram-se lacunas de osteócitos vazias a partir do 21º dia, sugerindo que a resposta ao trauma estaria se expandindo para áreas distantes da inserção do dispositivo. Entretanto, não houve correlação significativa desse dado com a disposição do infiltrado inflamatório, sugerindo que o maior percentual de lacunas vazias de osteócitos no GAZ também não significou uma osteonecrose em áreas distantes da instalação da lesão óssea. A caracterização imuno-celular da OMB realizada por Silva *et al.* (2016), constatou dentre outros aspectos, um aumento dose-dependente das lacunas de osteócitos vazias nos grupos tratados com AZ. Sugere-se que este fármaco teria um efeito tóxico direto sobre os osteócitos

e osteoblastos ou, por promover a ausência de remodelação óssea, essas áreas necróticas presentes no tecido ósseo não seriam naturalmente removidas (HUJA *et al.*, 2011).

Estudos que abordaram a cicatrização em sítios ósseos de MI encontraram uma taxa de remodelação óssea significativamente menor em animais tratados com AZ. No entanto, também foi relatado uma taxa de formação óssea que variou entre 9,5% a 43%, sugerindo que alguma resposta cicatricial é possível apesar do uso de um BF potente (HUJA *et al.*, 2011). A taxa de falhas apontada por estes autores foi relacionada a ausência de carga aplicada aos dispositivos, outro fator que pode ter contribuído para a similaridade do deslocamento do MI entre os grupos do nosso estudo, já que ambos receberam força imediata após a instalação.

A inibição do movimento dentário promovida pelos BFs pôde ser constatada por diversos autores através da medição manual. Uma medida histológica também utilizada por Salazar *et al.* (2015), foi adicionada, e verificou-se que o AZ mantém uma quantidade de deslocamento similar do 1ºMSE ao longo de todo o período analisado, contrapondo-se ao GC que aumenta significativamente nos dias 21 e 28. Estudos descritos na literatura reforçam os atuais achados apesar de diferirem entre si na dose utilizada de AZ, design experimental do aparelho ortodôntico e tipos de análises realizadas (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2016; ORTEGA *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2021). Os efeitos inibitórios são atribuídos principalmente a interferência dos BFs na diferenciação e atividade dos osteoclastos, tendo um efeito aumentado quando se tratam de BFsN como o AZ, comprometendo a remodelação óssea necessária para que ocorra a movimentação (FRANZONI *et al.*, 2017).

Um movimento apreciável do 1ºMSE foi obtido em ambos os grupos já a partir de 7 dias de MDI de forma semelhante a outros estudos com ancoragem esquelética como o de Fernández-González *et al.* (2016), que exibiu movimentação em 7, 14 e 21 dias.

O protocolo semanal consecutivo de três aplicações do AZ utilizado foi semelhante ao de Venkataramana *et al.* (2014), onde o Pamidronato foi o BF aplicado semanalmente em um período de tração dentária de 21 dias. Uma redução significativa da quantidade de movimento dentário foi verificada no grupo que recebeu o medicamento, validando o presente resultado quando se leva em consideração que o Pamidronato é um BFnN de segunda geração e que BFs administrados por via EV como o AZ tem maior biodisponibilidade e por consequência, maior efeito.

Outro trabalho publicado por Kaipatur *et al.* (2013) demonstrou que não houve diferença significante quando o Alendronato de Sódio foi administrado concomitantemente ou previamente ao período de tração dentária em um modelo de MDI com ancoragem esquelética. No presente protocolo experimental as administrações EV de AZ foram realizadas previamente

ao início da MDI sendo demonstrado histologicamente que um tecido ósseo carregado por um BF potente interfere no movimento ortodôntico.

Os efeitos da MDI no tecido pulpar ainda permanecem conflitantes e estão associados a desorganização da camada de odontoblastos, fibrose, alterações vasculares e calcificações (CUOGHI *et al.*, 2018). Sabe-se que a indução ortodôntica promove uma inflamação pulpar temporal promovida pela liberação de citocinas pró-inflamatórias tais como: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6 e TNF- $\alpha$  e diversos estudos analisam as reações pulpares como de fato, reversíveis, inalterando assim a fisiologia pulpar (BÖHL *et al.*, 2016). Os presentes resultados indicam ausência de alterações pulpares apesar de termos avaliado um tempo relativamente extenso de movimentação quando comparado a outros estudos de MDI.

O estudo de Cuoghi *et al.* (2018) que avaliou critérios de celularidade, alterações distróficas, hemodinâmicas e dentinárias em diferentes tipos de força e tração ortodôntica de 5, 7 e 9 dias, não observou diferenças significativas em nenhum grupo ou período. Massaro *et al.* (2009) associou ocasional descontinuidade e vacuolização celular da camada de odontoblastos a artefatos e não em decorrência da MDI. Os achados dessa pesquisa então confirmam que em um período maior de indução ortodôntica, as alterações observadas no tecido pulpar são leves ou ausentes.

Os resultados obtidos por Böhl *et al.* (2016) podem ser plenamente compatibilizados com os da presente pesquisa, visto que também avaliaram ratos adultos (400-550g) e o tempo de aplicação da força chegou a 12 semanas. Estes autores observaram regularidade tanto da camada odontoblástica como da pré-dentina, o que corresponde ao escore 0 dos fenômenos pulpares na presente análise, e que foi predominante em ambos os grupos. Consolaro & Consolaro (2018), relatam que o movimento ortodôntico não produz alterações pulpares degenerativas, morfológicas ou inflamatórias evidenciadas microscopicamente.

Modificações provenientes do tratamento com AZ, não foram observadas no tecido pulpar, dado que, o lado não submetido a MDI não apresentou alterações pulpares significativas entre os grupos. Também não se visualizou a presença de calcificação e obliteração pulpar relatadas em um estudo retrospectivo de Moraes *et al.* (2014). Sugere-se que os efeitos tóxicos do AZ seriam menores enquanto ele permanece ligado ao Fosfato de cálcio, mostrando uma improbabilidade dele reduzir a viabilidade do tecido pulpar (CVIKL *et al.*, 2011). Os resultados do presente estudo podem ser corroborados pela investigação realizada por Silva *et al.* (2019) onde a dose de 0,2 mg/kg de AZ não promoveu alterações do perfil histológico da polpa dentária em relação a dentina tubular, volume pulpar e o número de células inflamatórias.

Pourgonabadi *et al.* (2018) sugeriram que o Zoledronato prejudicaria o reparo dos tecidos na região orofacial. Este estudo *in vitro* demonstrou que a incubação do AZ por longos períodos reduz a atividade proliferativa da polpa dentária. O provável mecanismo anti-proliferativo está relacionado a redução de proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-2 e o aumento das pró-apoptóticas como a Caspase. Em virtude da literatura ser escassa de trabalhos específicos da ação do AZ em um tecido pulpar que foi submetido a MDI, e a presente avaliação ter sido exclusivamente histológica, os resultados foram comparados com os obtidos tanto por estudos *in vitro* como *in vivo* dos efeitos dos BFs na polpa dental.

Sabe-se que as respostas periodontais à tração ortodôntica envolvem diversos grupos celulares e incluem ativação de osteoclastos para reabsorção óssea na direção do movimento, ativação de metaloproteinases, recrutamento de células inflamatórias e angiogênese (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2016). Vale ressaltar ser de fundamental importância um LP viável capaz de nutrir as células fundamentais da remodelação óssea, os osteoclastos e osteoblastos.

Nesse sentido, Franzoni *et al.* (2017) ressaltaram as propriedades anti-angiogênicas dos BFs demonstradas pela redução do número de vasos sanguíneos e que podem contribuir para comprometer o movimento ortodôntico. Os fenômenos periodontais decorrentes da MDI demonstraram homogeneidade entre os grupos e nos diferentes tempos de ativação ortodôntica, mostrando que apesar da redução do deslocamento dentário, o GAZ manteve as alterações esperadas pela indução de forças ortodônticas. Constatou-se que o AZ isoladamente não foi responsável por alterações periodontais, já que o LP se manteve íntegro no lado em que não houve movimentação, apesar das injeções do fármaco.

Os achados de reabsorção radicular externa, efeito bem conhecido e resultante de procedimentos ortodônticos, concordam com Brunet *et al.* (2016) o qual não visualizaram redução significativa na quantidade de reabsorção no grupo submetido a MDI e tratado com AZ, contrapondo-se ao estudo de Mori *et al.* (2010) que verificaram tanto a limitação da reabsorção radicular quanto uma menor reabsorção do cimento em dentes reimplantados que foram previamente tratados com AZ.

Seifi *et al.* (2017) analisando o efeito do Zolena, um AZ produzido no Irã, na MDI, observaram uma redução significativa do número e extensão das áreas de reabsorção radicular. No presente estudo não foram quantificadas as áreas encontradas microscopicamente de reabsorção dentinária e/ou cementária, entretanto, verificou-se que elas estão presentes em todos os dias de MDI e em ambos os grupos, o que está em consonância com Zhou *et al.* (2018) quando verificaram que a reabsorção radicular resultante do deslocamento mesial do 1ºMSE

em diferentes tempos e forças de 20, 50 e 100g, já estava presente em 3 dias de movimentação independente da magnitude de força aplicada.

Na atual análise foi observada a formação de áreas de hialinização, as quais, conforme relatado por Ariffin *et al.* (2011), podem ser encontradas 24 horas após a aplicação das forças mecânicas e são removidas por macrófagos. Existe uma forte associação dessas áreas desprovidas de células e repletas de matriz extracelular, às forças severas e pesadas, não permitindo assim, o deslocamento dentário (CONSOLARO & CONSOLARO, 2018). Constatou-se a eficácia da força ortodôntica aplicada pelas alterações microscópicas induzidas no LP, incluindo a migração apical do epitélio juncional evidenciada também por Fernández-González *et al.* (2016).

O LP correspondente a área de MDI entre o 1º e 2º MSE foi analisado em relação ao seu principal constituinte, as fibras colágenas. Os resultados do percentual de colágeno total podem ser corroborados por Sousa *et al.* (2021), pois só foram observadas diferenças significantes no conteúdo de colágeno entre os grupos tratados com AZ e com solução salina submetidos a MDI, após a polarização da luz, sugerindo que em ambos os estudos a remodelação periodontal estava ocorrendo concomitantemente à aplicação das cargas ortodônticas. No presente estudo, o tratamento com AZ não modificou significativamente o processo de reparo do LP quando não houve MDI, dados divergentes dos publicados por Scheper *et al.* (2009) que demonstraram efeitos apoptóticos resultantes de altas concentrações do AZ nos fibroblastos.

Observou-se uma redução da relação entre o colágeno Tipo I e Tipo III no dia 14, fase inicial da inflamação promovida pelas forças ortodônticas, semelhantes aos achados de Li *et al.* (2019) onde verificaram acúmulo de colágeno Tipo III nas fases iniciais da remodelação, estando relacionado à diminuição das tensões no LP, sendo posteriormente substituído pelo colágeno tipo I. Os resultados desta pesquisa demonstram similaridade com estudos exclusivos de MDI, quando não houve aplicação de AZ.

No lado submetido a MDI, a redução significativa de colágeno tipo I no GAZ quando comparado ao GC com 14 dias de indução, pode ser explicada pelo estudo de Komatsu *et al.* (2016) em que verificaram que o AZ suprime a diferenciação de miofibroblastos induzida por TGF- $\beta$ 1, reduzindo assim, a síntese de colágeno tipo I. Essa redução também pode ser validada por Suparwitri *et al.* (2019), visto que, níveis reduzidos de TGF- $\beta$ 1 foram verificados no 14º dia, correspondendo a fase de latência da MDI. Esses dados sugerem uma ação do AZ associada a redução do deslocamento dentário, ambos contribuindo na redução de colágeno tipo I no dia

14. Nos dias 21 e 28 com a redução do processo inflamatório induzido pelas forças ortodônticas, visualizou-se um aumento do percentual de colágeno Tipo I no GAZ em relação ao dia 14.

A presença ou não das CEM foi analisada durante o movimento dentário e verificou-se uma redução significativa dessas células no GC em relação aos dias iniciais de MDI quando comparada ao GAZ. Isso mostra que as CEM foram menos expressas em um maior tempo de MDI, sugerindo que em virtude do tecido ósseo estar sendo naturalmente reabsorvido pelo aumento do deslocamento dentário, não existiria estímulo para a produção das mesmas. Esses dados divergem de estudos que relatam que o movimento ortodôntico não causaria necrose e sim o aumento da quantidade de CEM em resposta aos estímulos mecânicos (TALIC *et al.*, 2003).

Pela influência desse grupo de células no metabolismo e remodelação no LP, sugere-se que ele evita um processo de anquilose durante o movimento dentário, especialmente pela liberação de fatores de crescimento epidérmico (FCE), promovendo osteoclastasia. Logo, no lado em que houve a indução ortodôntica, no GAZ a redução das CEM ocorreu mais lentamente ao longo do período do que no GC, de forma que no último dia de MDI houve ausência total dessas células no GC e no GAZ ainda estavam presentes em 33%, percentual esse reduzido quase pela metade quando comparado ao início da movimentação no dia 7. Isso pode ser explicado pelo deslocamento dentário estar sendo inibido pela ação do AZ e uma situação semelhante à anquilose pode ter sido gerada, mantendo-se a produção das CEM para prevenir essa condição. Além disso, as CEM estão relacionadas ao reparo do cimento, atuando de forma oposta à MDI que pode provocar degradação dos cementoblastos (SILVA *et al.*, 2017). Durante as análises do presente estudo verificou-se um maior dano cementário aos grupos de maior tempo de tração ortodôntica, o que pode ser explicado pelo menor percentual de CEM.

Uma diminuição significativa das CEM em relação aos dias experimentais iniciais ocorreu no GAZ no lado não submetido a MDI, mostrando uma possível ação isolada do AZ na redução da presença de Malassez, que não está associada a movimentação ortodôntica. Estudos *in vitro* como o de Scheper *et al.* (2009) detectaram o efeito tóxico dos BFs em células da mucosa oral. Allam *et al.* (2011) demonstraram uma redução significativa de MMP-9, enzimas necessárias ao processo de re-epitelização de feridas orais, além do aumento significativo da caspase-3 em células epiteliais de animais submetidos ao tratamento com AZ. Os efeitos negativos de viabilidade celular do AZ sob os queratinócitos orais humanos também foram relatados (WANG *et al.*, 2019). Dessa forma, sendo as CEM definidas como células epiteliais que persistem ao redor da raiz, os efeitos tóxicos do AZ poderiam ser estendidos a este grupo de células residentes do LP. Por outro lado, em virtude dessa redução no lado não

movimentado ocorrer também no GC, mas sem influência significativa dos dias experimentais, especula-se que o estímulo promovido pela MDI possa ter gerado uma resposta em todo o osso alveolar, inclusive distante do lado submetido a movimentação, o que promoveu uma resposta das CEM similar ao lado movimentado.

Ressalta-se a que a interpretação dos achados do presente estudo deve considerar as diferenças anátomo-fisiológicas entre ratos e humanos, especialmente as do metabolismo superior dos animais, onde existe uma relação de 30 dias de vida do homem para um dia de vida do rato, além da inserção dos DTA ser minuciosa pela presença de numerosos seios faciais. Dessa forma, sugere-se que os MI ortodônticos não estariam contra-indicados na MDI nas quatro semanas avaliadas, sendo necessário cautela no uso clínico dos dispositivos de ancoragem principalmente em períodos prolongados.

## **5. Conclusão**

A administração do AZ em ratos reduziu as distâncias resultantes da MDI com ancoragem esquelética, e alterou a cicatrização óssea mediante o trauma causado pela inserção de um DTA. Foram observados sinais histológicos de dano ósseo proporcionado pelo MI, mas não houve OMB configurada decorrente do movimento ortodôntico ou do dispositivo de ancoragem. Além disso, não se verificaram efeitos deletérios do fármaco nos tecidos pulpar e periodontal, e sim, alterações exclusivamente periodontais decorrentes da tração ortodôntica. Finalmente, uma ação isolada do AZ nas CEM foi observada quando não houve indução do deslocamento dentário, o que pode sugerir sua toxicidade em células epiteliais.

## Referências

- Allam, E., Allen, M.R., Chu, T-M., Ghoneima, A., Windsor, L.J. (2011). In vivo effects of zoledronic acid on oral mucosal epithelial cells. *Oral Dis.*, 17(3), 291-7. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.01739.x>.
- Almeida, M.R. (2019). Biomechanics of extra-alveolar mini-implants. *Dental Press J Orthod.*, 24(4), 93-109. <https://doi.org/10.1590/2177-6709.24.4.093-109.sar>.
- Alves, A.P.N.N., Lima Júnior, E.M., Piccolo, N.S., De Miranda, M.J.B., Lima Verde, M.E.Q., Ferreira Júnior, A.E.C., Silva, P.G.B., Feitosa, V.P., Bandeira, T.J.P.G., Mathor, M.B., De Moraes, M.O. (2018). Study of tensiometric properties, microbiological and collagen content in Nile tilapia skin submitted to different sterilization methods. *Cell and Tissue Banking*, X, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9681-y>.
- Ariffin, S.H.Z., Yamamoto, Z., Abidin, I.Z.Z., Wahab, R.M.A.W., Ariffin, Z.Z. (2011). Cellular and Molecular Changes in Orthodontic Tooth Movement. *Scientific World Journal*, 11,1788-1803. <https://doi.org/10.1100/2011/761768>.
- Brunet, M.D., Araújo, C.M., Johann, A.C.B.R., Camargo, E.S., Tanaka, O.M., Filho, O.G. (2016). Effects of Zoledronic Acid on Orthodontic Tooth Movement in Rats. *Braz Dent J.*, 27(5), 515-23. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201600966>.
- Chen, Y.J., Chang, H.H., Lin, H.Y., Lai, E.H.H., Hung, H.C., Yao, C.C.J. (2008). Stability of miniplates and miniscrews used for orthodontic anchorage: experience with 492 temporary anchorage devices. *Clin Oral Implants Res.*, 19(11), 1188-96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2008.01571.x>.

Choi, S-H., Jeon, J.Y., Lee, K.J., Hwang, C-J. (2020). Clinical applications of miniscrews that broaden the scope of non-surgical orthodontic treatment. *Orthod Craniofac Res.*, 24(1), 48-58. <https://doi.org/10.1111/ocr.12452>.

Consolaro, A., Consolaro, R.A. (2018). There is no pulp necrosis or calcific metamorphosis of pulp induced by orthodontic treatment: biological basis. *Dental Press J. Orthod.*, 23(4), 36-42. <https://doi.org/10.1590/2177-6709.23.4.036-042.oin>.

Cuoghi, O.A., Faria, L.P., Ervolino, E., Barioni, S.R.P., Topolski, F., Arana-Chavez, V.E., Mendonça, M.R. (2018). Pulp analysis of teeth submitted to different types of forces: a histological study in rats. *J Appl Oral Sci.*, 26, 1-7. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0626>.

Cvick, B., Agis, H., Stögerer, K., Moritz, A., Watzek, G., Gruber, R. (2011). The response of dental pulp-derived cells to zoledronate depends on the experimental mode. *Int Endod J.*, 44(1), 33-40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2010.01792.x>.

Dai, Q., Zhou, S., Zhang, P., Ma, X., Ha, N., Yang, X., Yu, Z., Fang, B., Jiang, L. (2017). Force-induced increased osteogenesis enables accelerated orthodontic tooth movement in ovariectomized rats. *Sci Rep.*, 7(3906), 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04422-0>.

Dionisio, M.R., Mansinho, A., Abreu, C., Cavaco-Silva, J., Casimiro, S., Costa, L. (2019). Clinical and translational pharmacology of drugs for the prevention and treatment of bone metastases and cancer-induced bone loss. *Br J Clin Pharmacol.*, 85(6), 1114-1124. <https://doi.org/10.1111/bcp.13852>.

Estanislau IMG. Modelo experimental de movimentação dentária induzida com ancoragem esquelética: estudo morfológico. 2019. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2019.

Fernández-González, F.J., López-Caballo, J.L., Cañigral, A., Menéndez-Díaz, I., Brizuela, A., Cos, F.J., Cobo, T., Vega, J.A. (2016). Osteoprotegerin and zoledronate bone effects during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res.*, 19(1), 54-64.

Franzoni, J.S., Soares, F.M.P., Zaniboni, E., Vedovello Filho, M., Santamaria, M.P., Dos Santos, G.M.T., Esquisatto, M.A.M., Felonato, M., Mendonça, F.A.S., Franzini, C.M., Santamaria Jr, M. (2017). Zoledronic acid and alendronate sodium and the implications in orthodontic movement. *Orthod. Craniofac. Res.*, 20(3), 164-169. <https://doi.org/10.1111/ocr.12192>.

Gabet, Y., Kohavi, D., Voide, R., Mueller, T.L., Müller, R., Bab, I. (2010). Endosseous implant anchorage is critically dependent on mechanostructural determinants of peri-implant bone trabeculae. *J Bone Miner Res.*, 25(3), 575-83. <https://doi.org/10.1359/jbmr.090808>.

Gudhimella, S., Ibrahim, A.Y., Karanth, D., Kluemper, A.M., Westgate, P.M., Puleo, D.A., Huja, S.S. (2018). A rodent model using skeletal anchorage and low forces for orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*, 155(2): 254-263.

Huja, S.S., Kaya, B., Mo, X., D'Atri, A.M., Fernandez, S.A. (2011). Effect of zoledronic acid on bone healing subsequent to mini-implant insertion. *Angle Orthod.*, 81(3), 363-369. <https://doi.org/10.2319/070710-384.1>.

Huja, S.S., Mason, A., Fenell, C.E., Mo, X., Hueni, S., D'Atri, A.M., Fernandez, S.A. (2011). Effects of short-term zoledronic acid treatment on bone remodeling and healing at surgical sites in the maxilla and mandible of aged dogs. *J Oral Maxillofac.*, 69(2), 418-27. <https://10.1016/j.joms.2010.05.062>.

Kaipatur, N., Wu, Y., Adeeb, S., Stevenson, T., Major, P., Doschak, M. (2014). A Novel Rat Model of Orthodontic Tooth Movement Using Temporary Skeletal Anchorage Devices: 3D Finite Element Analysis and In Vivo Validation. *Int J Dent.*, 2014, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2014/917535>.

Kaipatur, N.R., Wu, Y., Adeeb, S., Stevenson, T.R., Major, P.W., Doschak, M.R. (2013) Impact of bisphosphonate drug burden in alveolar bone during orthodontic tooth movement in a rat model: A pilot study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*, 144(4), 557-67. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2013.06.015>.

Komatsu, Y., Ibi, M., Chosa, N., Kyakumoto, S., Kamo, M., Shibata, T., Sugiyama, Y., Ishisaki, A. (2016). Zoledronic acid suppresses transforming growth factor- $\beta$ -induced fibrogenesis by human gingival fibroblasts. *Int J Mol Med.*, 38(1), 139-47. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2582>.

Kondo, T., Hotokezaka, H., Hamanaka, R., Hashimoto, M., Nakano-Tajima, T., Arita, K., Kurohama, T., Ino, A., Tominaga, J., Yoshida, N. (2017). Types of tooth movement, bodily or tipping, do not affect the displacement of the tooth's center of resistance but do affect the alveolar bone resorption. *Angle Orthod.*, 87(4), 563-569. <https://doi.org/10.2319/110416-794.1>

Krishnan, S., Pandian, S., Kumar, A. (2015). Effect of Bisphosphonates on Orthodontic Tooth Movement - An Update. *J Clin Diagn Res.*, 9(4), 1-5. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/11162.5769>.

Leo, M., Cerroni, L., Pasquantonio, G., Condò, S.G., Condò, R. (2016). Temporary anchorage devices (TADs) in orthodontics: review of the factors that influence the clinical success rate of the mini-implants. *Clin Ter.*, 167(3). <https://doi.org/10.7417/CT.2016.1936>.

Li, Z., Yu, M., Jin, S., Wang, Y., Luo, R., Huo, B., Liu, D., He, D., Zhou, Y., Liu, Y. (2019). Stress Distribution and Collagen Remodeling of Periodontal Ligament During Orthodontic Tooth Movement. *Front Pharmacol.*, 10, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01263>.

Liu, H., Wang, S., Chen, S., Chen, C., Lin, T. (2019). Zoledronic acid blocks the interaction between breast cancer cells and regulatory T-cells. *BMC Cancer*, 19(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5379-9>.

Massaro, C.S., Consolaro, R.B., Santamaria Jr, M., Consolaro, M.F.M.O., Consolaro, A. (2009). Analysis of the dentin-pulp complex in teeth submitted to orthodontic movement in rats. *J Appl Oral Sci.*, 17, 35-42. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572009000700007>.

Moraes, P.C., Silva, C.A.B., Soares, A.B., Passador-Santos, F., Corrêa, M.E.P., Araújo, N.S., Araújo, V.C. (2015). Tooth alterations in areas of bisphosphonate-induced osteonecrosis. *Clin Oral Investig.*, 19(2), 489-95. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1270-x>.

Mori, G.G., Janjacom, D.M.M., Nunes, D.C., Castilho, L.R. (2010). Effect of Zoledronic Acid Used in the Root Surface Treatment of Late Replanted Teeth: A Study in Rats. *Braz Dent J.*, 21(5), 452-7. <https://doi.org/10.1590/s0103-64402010000500013>.

Mücke, T., Krestan, C.R., Mitchell, D.A., Kirschke, J.S., Wutzl, A. (2016). Bisphosphonate and Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: A Review. *Semin Musculoskelet Radiol.*, 20(3), 305-314. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1592367>.

Nakano, T., Hotokezaka, H., Hashimoto, M., Sirisoontorn, I., Arita, K., Kurohama, T., Ali Darendeliler, M., Yoshida, N. (2014). Effects of different types of tooth movement and force magnitudes on the amount of tooth movement and root resorption in rats. *Angle Orthod.*, 84(6), 1079-85. <https://doi.org/10.2319/121913-929.1>.

Norton, J.T., Hayashi, T., Crain, B., Cho, J.S., Miller, L.S., Corr, M., Carson, D.A. (2012). Cutting edge: nitrogen bisphosphonate-induced inflammation is dependent upon mast cells and IL-1. *J Immunol.*, 188(7), 2977-80. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100830>.

Ortega, A.J.A.J., Campbell, P.M., Hinton, R., Naidu, A., Buschang, P.H. (2012). Local application of zoledronate for maximum anchorage during space closure. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*, 142(6), 780-91. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2012.07.010>.

Park, H.S., Jeong, S.H., Kwon, O.W. (2006). Factors affecting the clinical success of screw implants used as orthodontic anchorage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*, 130(1), 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2004.11.032>.

Pourgonabadi, S., Mousavi, S.H., Tayarani-Najaran, Z., Ghorbani, A. (2019). Effect of zoledronate, a third-generation bisphosphonate, on proliferation and apoptosis of human dental pulp stem cells. *Can J Physiol Pharmacol.*, 96(2), 137-144. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0348>.

Rangiani, A., Jing, Y., Ren, Y., Yadav, S., Taylor, R., Feng, J.Q. (2016). Critical roles of periostin in the process of orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod.*, 38(4), 373-8. <https://doi.org/10.1093/ejo/cjv071>.

Russow, G., Jahn, D., Appelt, J., Märdian, S., Tsitsilonis, S., Keller, J. (2019). Anabolic Therapies in Osteoporosis and Bone Regeneration. *Int J Mol Sci.*, 20(1), 1-17. <https://doi.org/10.3390/ijms20010083>.

Salazar, M., Hernandez, L., Ramos, A.L., Salazar, B.O., Micheletti, K.R., Paranhos, L.R., Mendonça, M.R., Cuoghi, A.O. (2015). Effect of alendronate sodium on tooth movement in ovariectomized rats. *Arch Oral Biol.*, 60(5), 776-81. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.02.003>.

Scheper, M.A., Badros, A., Chaisuparat, R., Cullen, K.J., Meiller, T.F. (2009). Effect of Zoledronic Acid on Oral Fibroblasts and Epithelial Cells: A Potential Mechanism of Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis. *Br J Haematol.*, 144(5), 667-76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07504.x>.

Seifi, M., Asefi, S., Hatamifard, G., Lotfi, A. (2017). Effect of local injection of Zolena, zoledronic acid made in Iran, on orthodontic tooth movement and root and bone resorption in rats. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*, 11(4), 257-264. <https://doi.org/10.15171/joddd.2017.045>.

Silva e Silva, B., Fagundes, N.C.F., Nogueira, B.C.L., Neto, J.V., Normando, D., Lima, R.R. (2017). Epithelial rests of Malassez: from latent cells to active participation in orthodontic movement. *Dental Press J Orthod.*, 22(3), 119-125. <https://doi.org/10.1590/2177-6709.22.3.119-125.sar>.

Silva, P.G.B., Ferreira Jr, A.E.C., Oliveira, C.C., Lima Verde, M.E.Q., Freitas, M.O., Sousa, F.B., Mota, M.R.L., Alves, A.P.N.N. (2019). Chronic treatment with zoledronic acid alters the expression levels of inflammatory, bone, and apoptotic markers and Toll-like receptors 2 and 4 in rat dental pulp. *Oral and Maxillofacial Pathol.*, 128(2), 139-145. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2019.01.069>.

Silva, P.G.B., Ferreira Jr, A.E.C., Teófilo, C.R., Barbosa, M.C., Júnior, R.C.P.L., Sousa, F.B., Mota, M.R.L., Ribeiro, R.A., Alves, A.P.N.N. (2015). Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Arch of Oral Biol.*, 60(9), 1237-45. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.015>.

Silva, P.G.B., Oliveira, C.C., Brizeno, L.A.C., Wong, D.V.T., Lima Júnior, R.C.P., Gonçalves, R.P., Sousa, F.B., Mota, M.R.L., Ribeiro, R.A., Alves, A.P.N.N. (2016). Immune cellular profile of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Dis.*, 22(7), 649-57. <https://doi.org/10.1111/odi.12513>.

Sousa, F.R.N., Ferreira, V.C.S., Martins, C.S., Dantas, H.V., Sousa, F.B., Girão-Carmona, V.C.C., Góes, P., Brito, G.A.C.B., Leitão, R.F.C. (2021). The effect of high concentration of zoledronic acid on tooth induced movement and its repercussion on root, periodontal ligament and alveolar bone tissues in rats. *Sci Rep.*, 11(7672), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87375-9>.

Souza, R.A., Neto, J.R., Paiva, J.B. (2019). Maxillary protraction with rapid maxillary expansion and facemask versus skeletal anchorage with mini-implants in class III patients: a non-randomized clinical trial. *Prog Orthod.*, 20(35), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s40510-019-0288-7>.

Suparwitri, S., Noviasari, P. (2019). Effect of olive oil administration on the level of transforming growth factor  $\beta$ 1 during orthodontic tooth movement in old and young guinea pigs. *F1000Res.*, 8, 1-15. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21177.2>.

Talic, N.F., Evans, C.A., Daniel, J.C., Zaki, A.E. (2003). Proliferation of epithelial rests of Malassez during experimental tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*, 123(5), 527-33. <https://doi.org/10.1067/mod.2003.S0889540602000185>.

Teófilo, C.R., Ferreira Júnior, A.E.C., Batista, A.C., Jamararu, F.V.F., Sousa, F.B., Mota, M.R.L., Silva, M.F., Silva, P.G.B., Alves, A.P.N.N. (2020). Mast Cells and Blood Vessels Profile in Oral Carcinogenesis: An Immunohistochemistry Study. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 21(4), 1097-1102. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.4.1097>.

Venkataramana, V., Chidambaram, S., Reddy, B.V., Goud, E.V, Arafath, M., Krishnan, S. (2014). Impact of Bisphosphonate on Orthodontic tooth movement and osteoclastic count: An Animal Study. *J Int Oral Health*, 6(2), 1-8.

Von Böhl, M., Ren, Y., Kuijpers-Jagtman, A.M., Fudalej, P.S., Maltha, J.C. (2016). Age-related changes of dental pulp tissue after experimental tooth movement in rats. *PeerJ.*, 4, 1-14. <https://doi.org/10.7717/peerj.1625>.

Wang, Q., Liu, J., Guo, T., Liu, D., Pan, J. (2019). Epidermal Growth Factor Reverses the Inhibitory Effects of the Bisphosphonate, Zoledronic Acid, on Human Oral Keratinocytes and Human Vascular Endothelial Cells In Vitro via the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)/Akt/Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) Signaling Pathway. *Med Sci Monit.*, 25, 700-710. <https://doi.org/10.12659/MSM.911579>.

Wu, T.Y., Kuang, S.H., Wu, C.H. (2009). Factors associated with the stability of mini-implants for orthodontic anchorage: a study of 414 samples in Taiwan. *J Oral Maxillofac Surg.*, 67(8), 1595-9. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2009.04.015>.

Yano, S., Motoyoshi, M., Inaba, M., Yano, S., Takenouchi, H., Son, S., Arai, Y., Shimizu, N. (2014). A healing period increases mini-implant stability in growing rats. *J Oral Sci.*, 56(2), 113-8. <https://doi.org/10.2334/josnusd.56.113>.

Zhou, J., Yang, F., Xu, X., Feng, G., Chen, J., Song, J., Dai, H. (2018). Dynamic Evaluation of Orthodontically-Induced Tooth Movement, Root Resorption, and Alveolar Bone Remodeling in Rats by *in Vivo* Micro- Computed Tomography. *Med Sci Monit.*, 24, 8306-8314. <https://doi.org/10.12659/MSM.912470>.

## TABELAS

**Tabela 2:** Análise qualitativa e quantitativa do infiltrado inflamatório no tecido ósseo de suporte do Mini-implante.

	Tempo (dias)				p-Valor
	D7	D14	D21	D28	
<b>Intensidade do infiltrado inflamatório</b>					
Sal	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-3)	1 (0-3)	0.428 <sup>b</sup>
AZ	2 (1-2)	1 (1-2)	2 (0-3)	1 (1-3)	0.613 <sup>b</sup>
<b>p-Valor</b>	0.310 <sup>a</sup>	0.914 <sup>a</sup>	0.556 <sup>a</sup>	0.589 <sup>a</sup>	
<b>Disposição do infiltrado inflamatório</b>					
<b>Sal</b>					
Focal	60%	17%	40%	60%	0.408 <sup>c</sup>
Difuso	40%	83%	60%	40%	
<b>AZ</b>					
Focal	0%	0%	0%	0%	0.151 <sup>c</sup>
Difuso	100%	100%	75%	100%	
<b>p-Valor</b>	<b>0.034<sup>c</sup></b>	0.444 <sup>c</sup>	0.342 <sup>c</sup>	<b>0.034<sup>c</sup></b>	
<b>Tipo do infiltrado inflamatório</b>					
<b>Sal</b>					
Ausente	0%	0%	0%	17%	0.346 <sup>c</sup>
PMN	40%	17%	0%	0%	
Misto	60%	33%	60%	33%	
MN	0%	50%	40%	50%	
<b>AZ</b>					
Ausente	0%	0%	25%	0%	<b>0.032<sup>c</sup></b>
PMN	40%	0%	25%	66%	
Misto	60%	0%	25%	17%	
MN	0%	100%	25%	17%	
<b>p-Valor</b>	1.000 <sup>c</sup>	0.240 <sup>c</sup>	0.353 <sup>c</sup>	0.096 <sup>c</sup>	

\*p<0.05, <sup>a</sup>Teste Mann-Whitney; <sup>b</sup>Teste Kruskal-Wallis/Dunn [mediana (mínimo– máximo)]; <sup>c</sup>Teste exato de Fisher ou Qui-quadrado de Pearson.

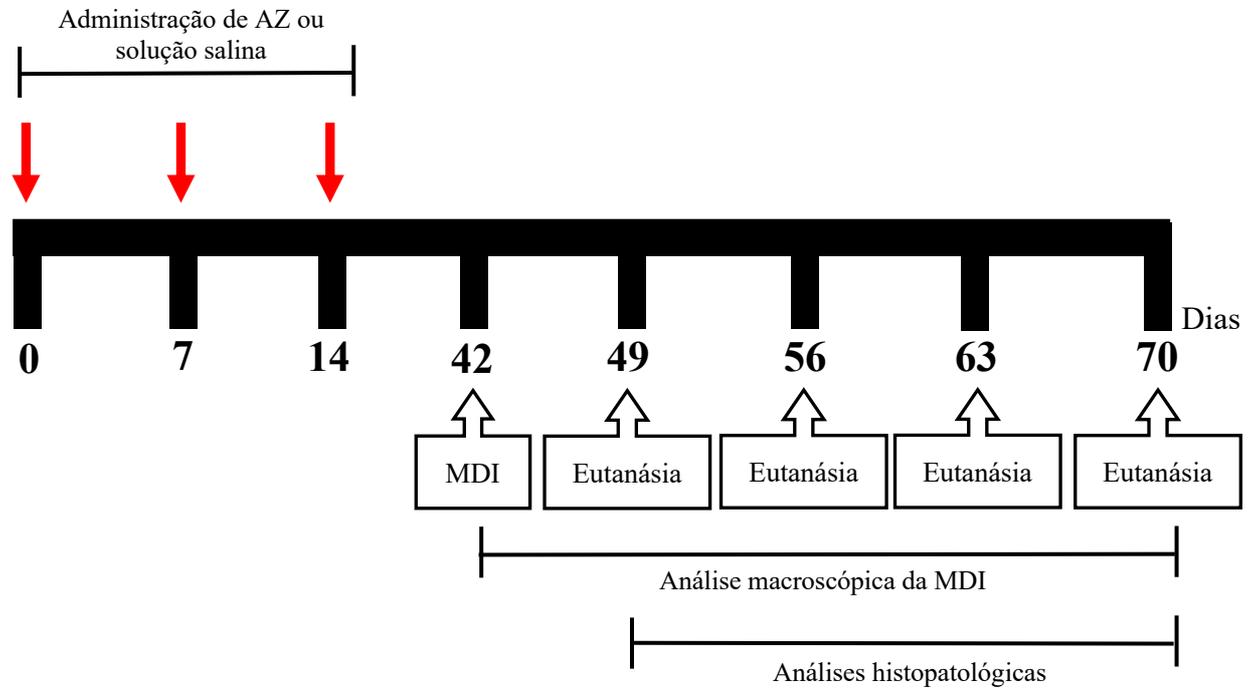
**Tabela 3:** Análise histológica do lado não movimentado e movimentado em relação aos escores atribuídos aos fenômenos pulpares e periodontais e porcentagem da presença de restos epiteliais de Malassez.

	Tempo (Dias)				p-Valor
	D7	D14	D21	D28	
<b>Fenômenos pulpares</b>					
<b>Não movimentado</b>					
Sal	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)	0.295 <sup>b</sup>
AZ	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0.557 <sup>b</sup>
<b>p-Valor</b>	0.914 <sup>a</sup>	0.476 <sup>a</sup>	0.556 <sup>a</sup>	0.699 <sup>a</sup>	
<b>Movimentado</b>					
Sal	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-1)	0.495 <sup>b</sup>
AZ	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-2)	0.928 <sup>b</sup>
<b>p-Valor</b>	1.000 <sup>a</sup>	0.914 <sup>a</sup>	0.556 <sup>a</sup>	0.818 <sup>a</sup>	
<b>Fenômenos periodontais</b>					
<b>Não movimentado</b>					
Sal	0 (0-1)	0 (0-2)	0 (0-0)	0 (0-0)	0.551 <sup>b</sup>
AZ	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	1.000 <sup>b</sup>
<b>p-Valor</b>	0.690 <sup>a</sup>	0.762 <sup>a</sup>	1.000 <sup>a</sup>	1.000 <sup>a</sup>	
<b>Movimentado</b>					
Sal	3 (3-3)	3 (3-3)	3 (1-3)	3 (3-3)	0.334 <sup>b</sup>
AZ	3 (3-3)	3 (2-3)	3 (3-3)	3 (3-3)	0.290 <sup>b</sup>
<b>p-Valor</b>	1.000 <sup>a</sup>	0.610 <sup>a</sup>	0.730 <sup>a</sup>	1.000 <sup>a</sup>	
<b>Células epiteliais de Malassez</b>					
<b>Não movimentado</b>					
Sal	80%	17%	0%	0%	0.950 <sup>c</sup>
AZ	60%	50%	25%	33%	<b>0.045<sup>c</sup></b>
<b>p-Valor</b>	1.000 <sup>c</sup>	0.500 <sup>c</sup>	0.444 <sup>c</sup>	0.455 <sup>c</sup>	
<b>Movimentado</b>					
Sal	80%	17%	0%	0%	<b>0.005<sup>c</sup></b>
AZ	60%	50%	25%	33%	0.699 <sup>c</sup>
<b>p-Valor</b>	0.197 <sup>c</sup>	1.000 <sup>c</sup>	0.635 <sup>c</sup>	1.000 <sup>c</sup>	

\*p<0.05, <sup>a</sup>Teste Mann-Whitney; <sup>b</sup>Teste Kruskal-Wallis/Dunn [mediana (mínimo– máximo)]; <sup>c</sup>Teste exato de Fisher ou Qui-quadrado de Pearson.

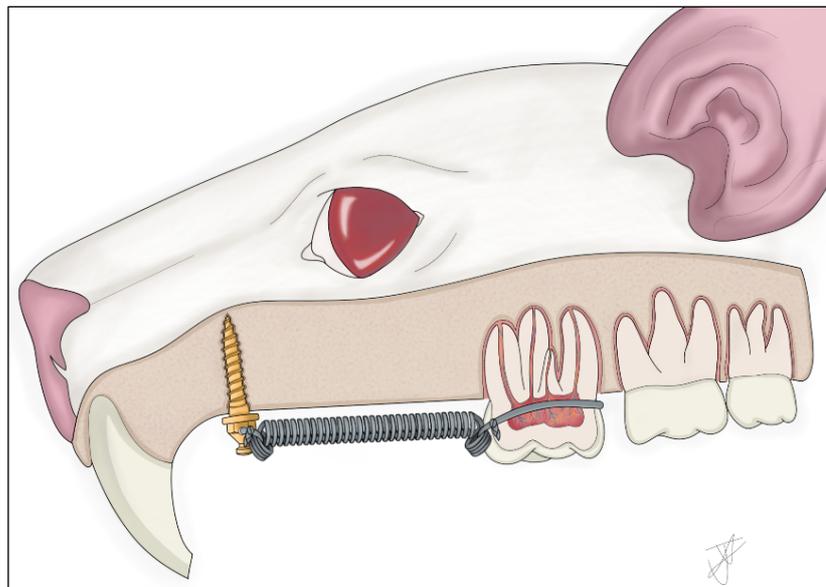
## FIGURAS

**Figura 2:** Diagrama esquemático do protocolo experimental.



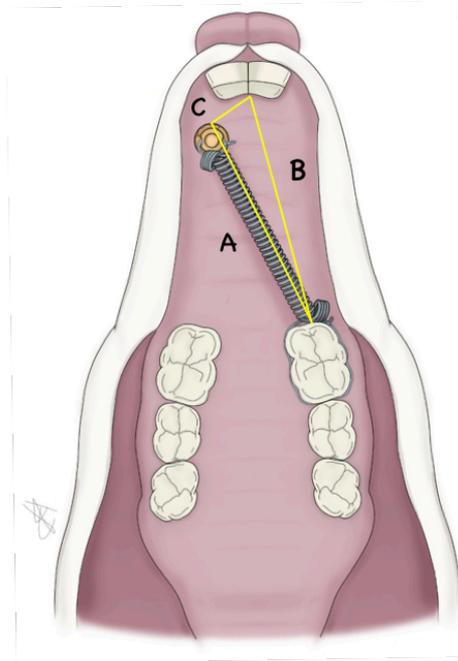
Fonte: Adaptado de SOUSA *et al.* (2021).

**Figura 3:** Desenho esquemático do modelo de MDI com ancoragem esquelética (Vista lateral).



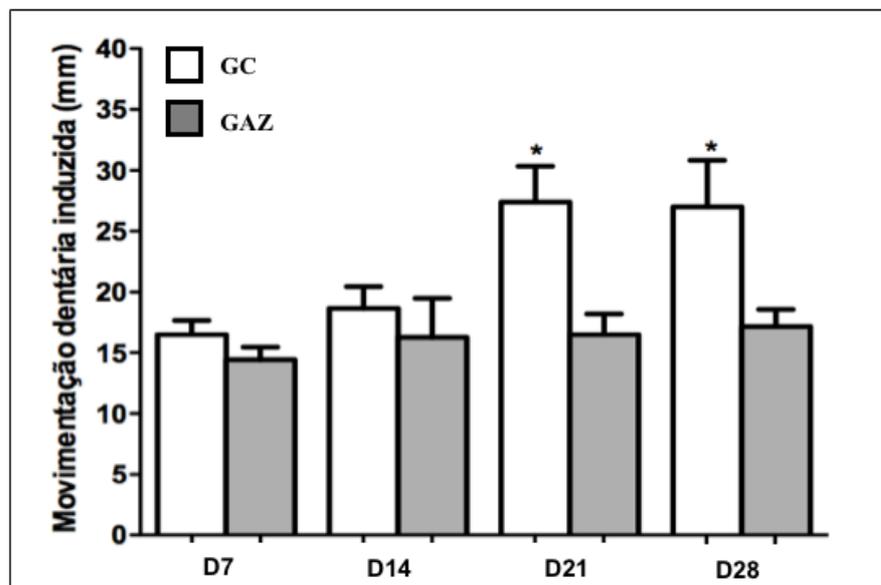
Fonte: Autoria própria (2021).

**Figura 4:** Desenho esquemático da mensuração macroscópica da MDI. O triângulo ilustrado na cor preta foi obtido a partir das medidas A, B e C (Vista oclusal).



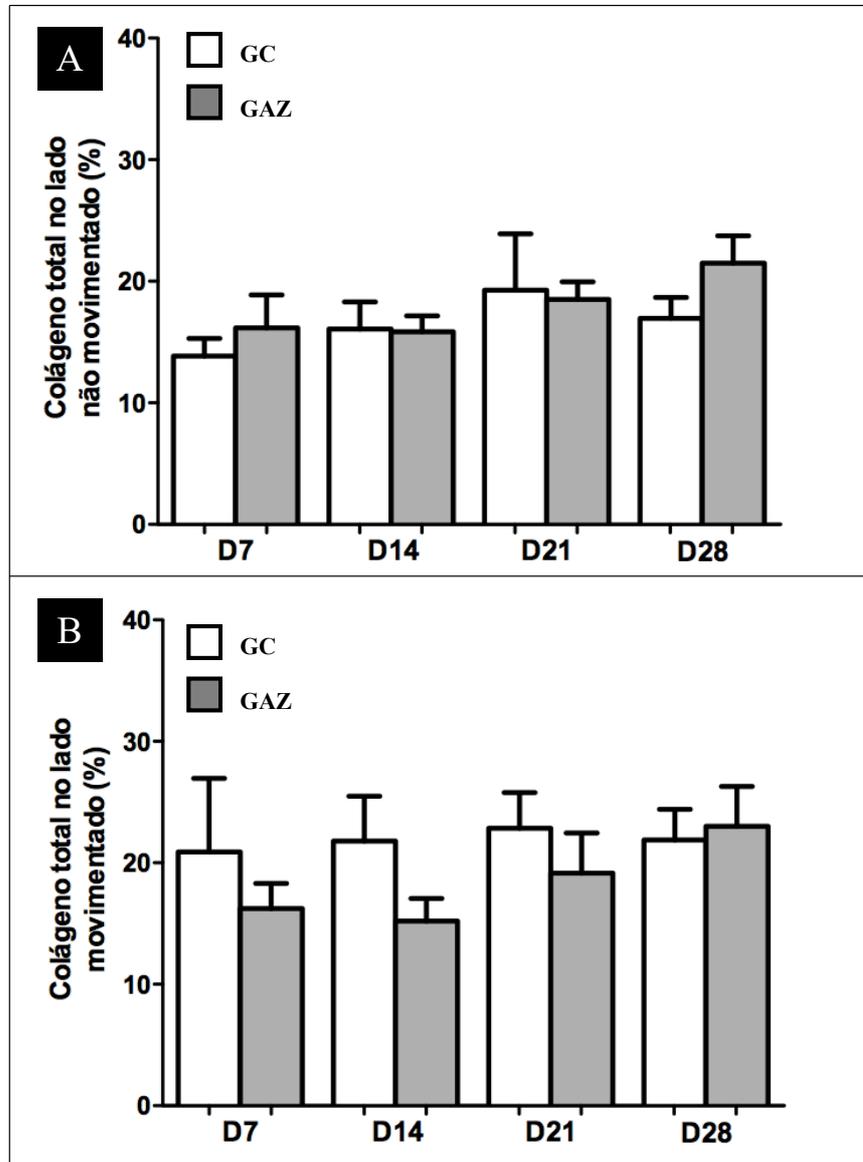
Fonte: Autoria própria (2021).

**Figura 5:** Avaliação microscópica da movimentação dentária induzida em milímetros (mm) mensurada com régua histológica entre o 1º e 2º MSE.



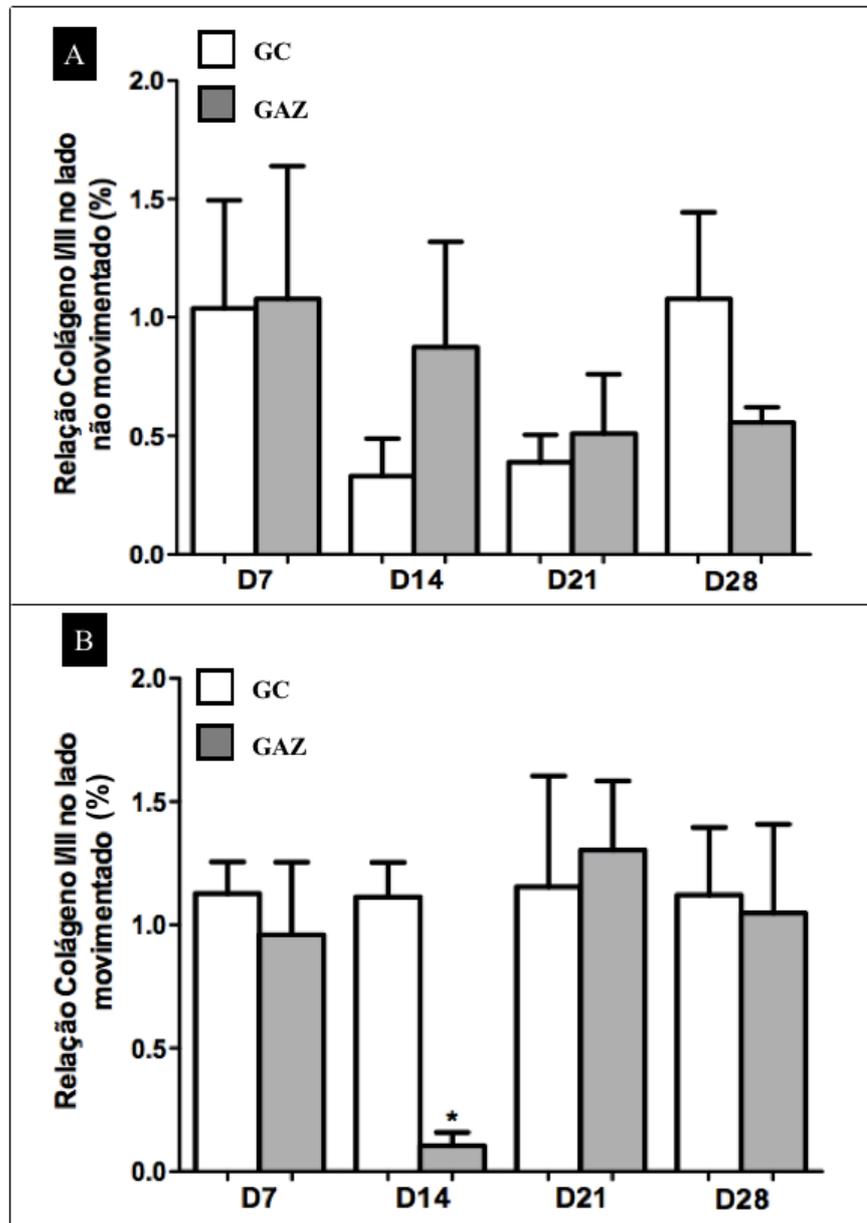
Legenda: D - tempo de movimentação dentária em dias, GC - grupo controle tratado com solução salina, GAZ - grupo teste tratado com Ácido Zoledrônico. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média \* $p < 0,05$  em relação ao grupo SAL [Teste ANOVA-1-way/Bonferroni].

**Figuras 6A e B:** Análise do percentual de colágeno total no lado não movimentado e movimentado, respectivamente.



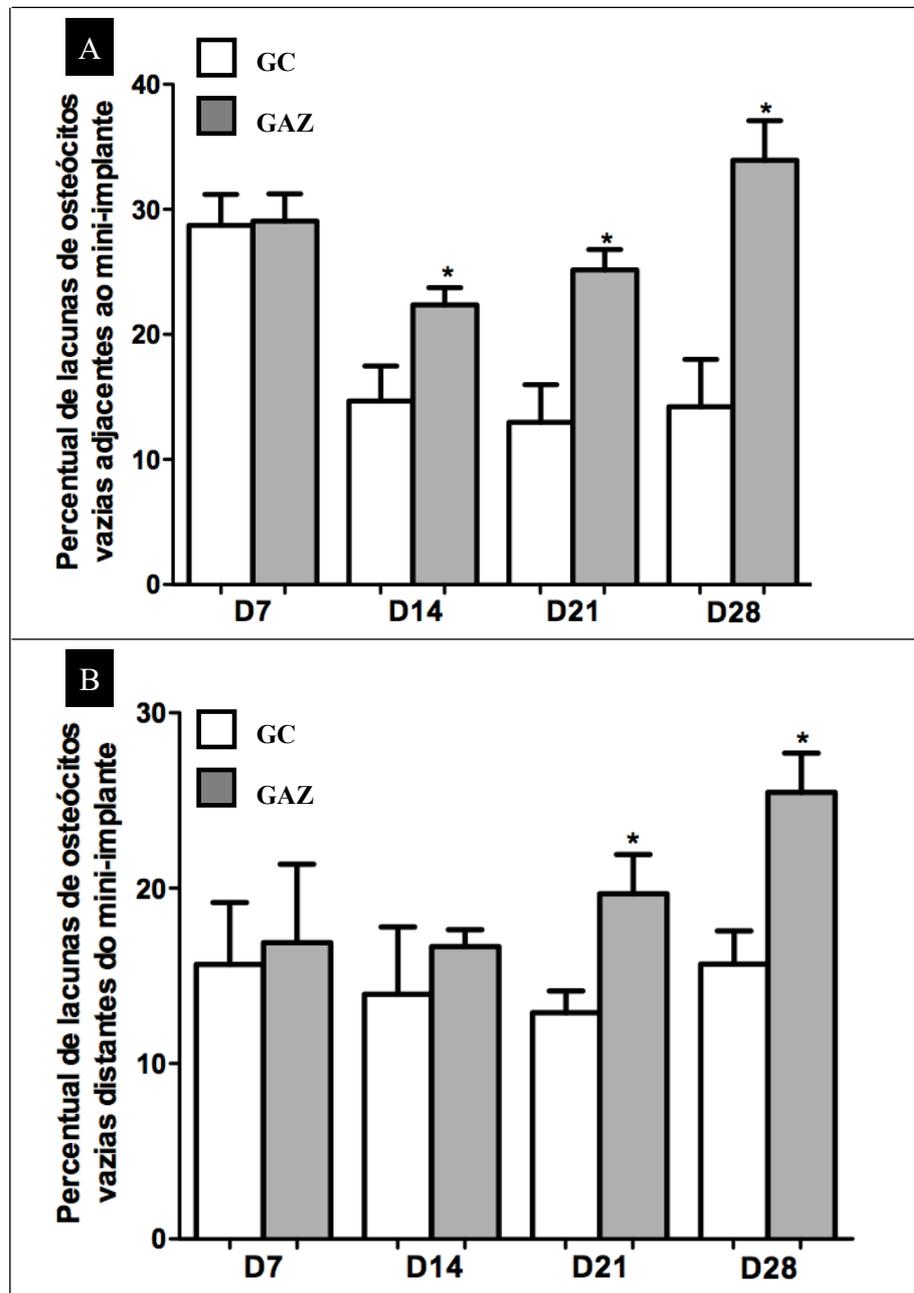
Legenda: D - tempo de movimentação dentária induzida em dias, GC - grupo controle tratado com solução salina, GAZ - grupo teste tratado com Ácido Zoledrônico. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média \* $p < 0,05$  em relação ao GC [Teste ANOVA-1-way/Bonferroni].

**Figuras 7A e B:** Análise da relação entre o colágeno tipo I e III no lado não movimentado e movimentado, respectivamente.



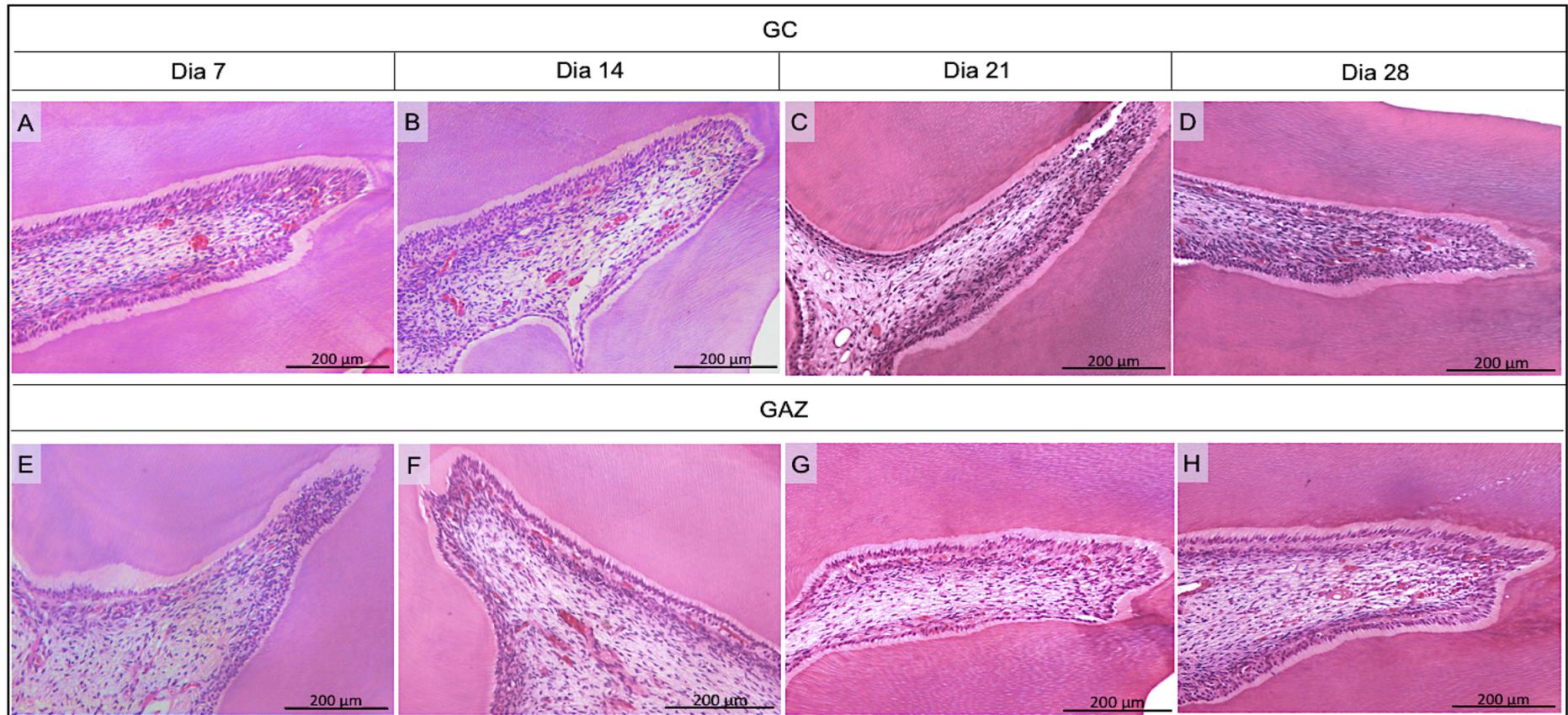
Legenda: D - tempo de movimentação dentária induzida em dias, GC - grupo controle tratado com solução salina, GAZ - grupo teste tratado com Ácido Zoledrônico. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média \* $p < 0,05$  em relação ao GC [Teste ANOVA-1-way/Bonferroni].

**Figuras 8A e B:** Análise do percentual de lacunas de osteócitos vazias adjacentes e distantes da área de inserção do MI, respectivamente.



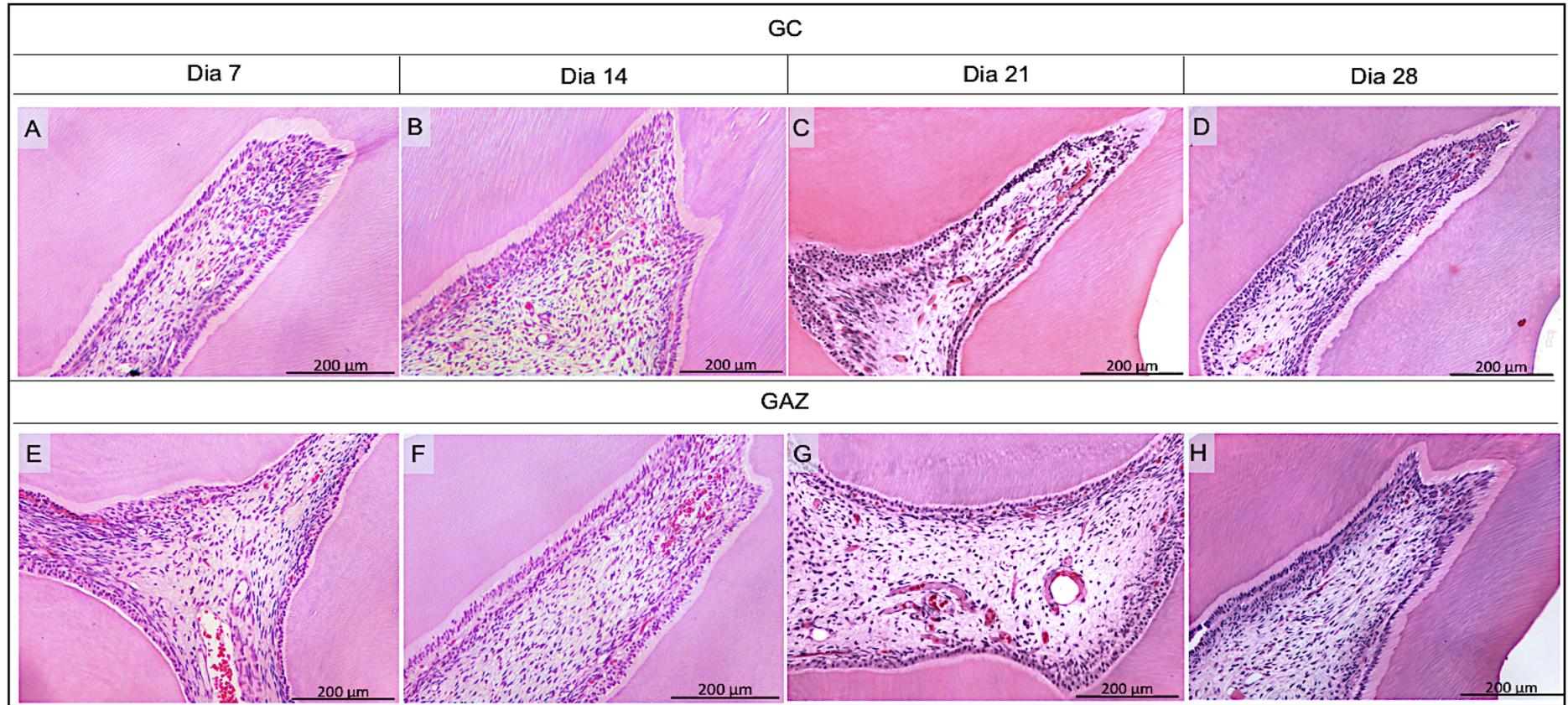
Legenda: D - tempo de movimentação dentária induzida em dias, GC - grupo controle tratado com solução salina, GAZ - grupo teste tratado com Ácido Zoledrônico. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média \* $p < 0,05$  em relação ao GC [Teste ANOVA-1-way/Bonferroni].

**Figura 9:** Fotomicrografias longitudinais do primeiro molar superior no lado não submetido a MDI no qual se avaliaram os fenômenos pulpres.



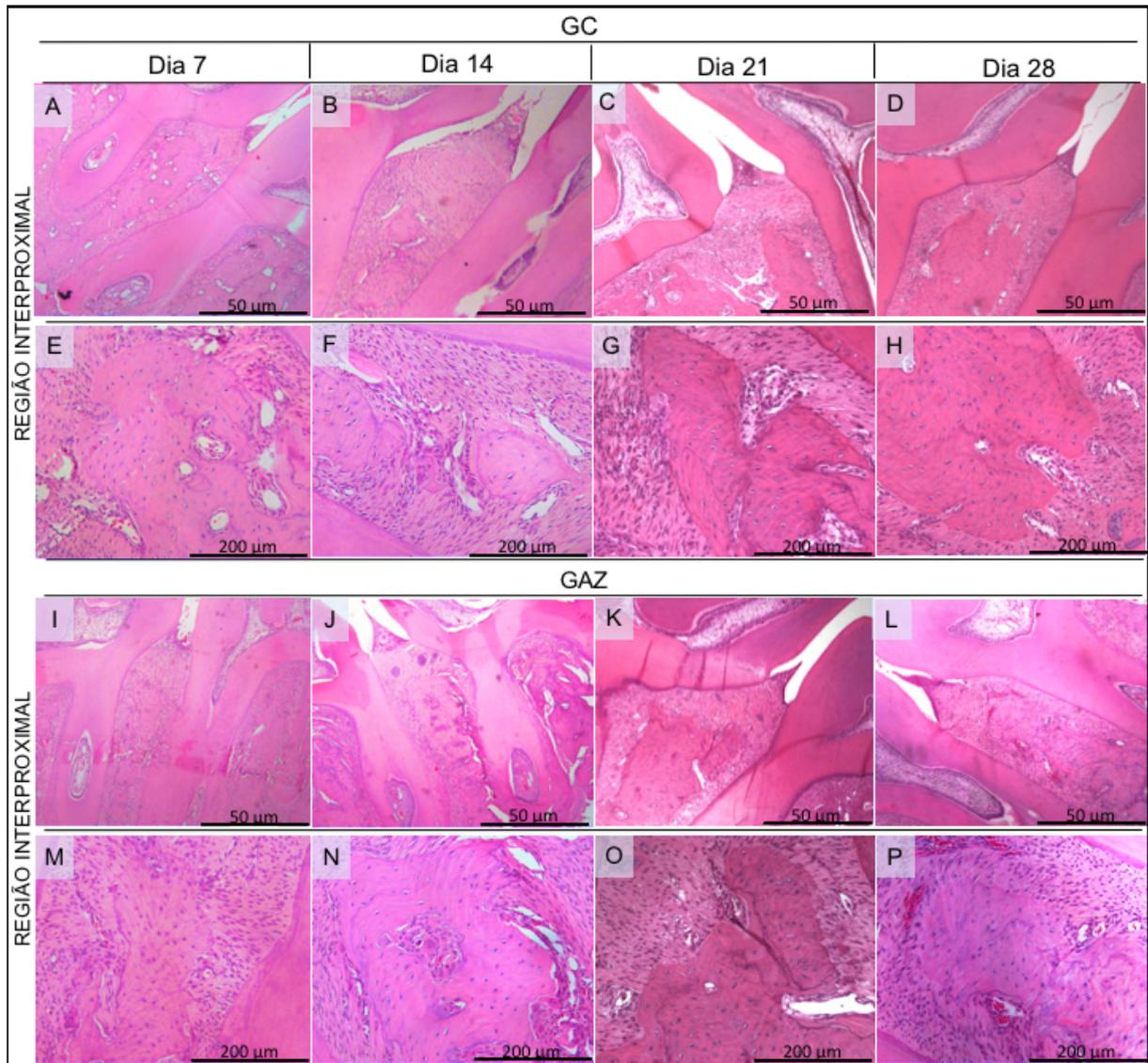
Legenda: A, B, C, D – Perfil celular da polpa dentária no Grupo controle (GC) não mostrando modificações no aspecto histológico nos dias 7, 14, 21 e 28, respectivamente (Coloração HE, 200x). E, F, G, H – Perfil celular da polpa dentária no Grupo teste tratado com Ácido Zoledrônico (GAZ) não mostrando modificações no aspecto histológico nos dias 7, 14, 21 e 28, respectivamente (Coloração HE, 200x).

**Figura 10:** Fotomicrografias longitudinais do primeiro molar superior no lado submetido a MDI no qual se avaliaram os fenômenos pulpares.



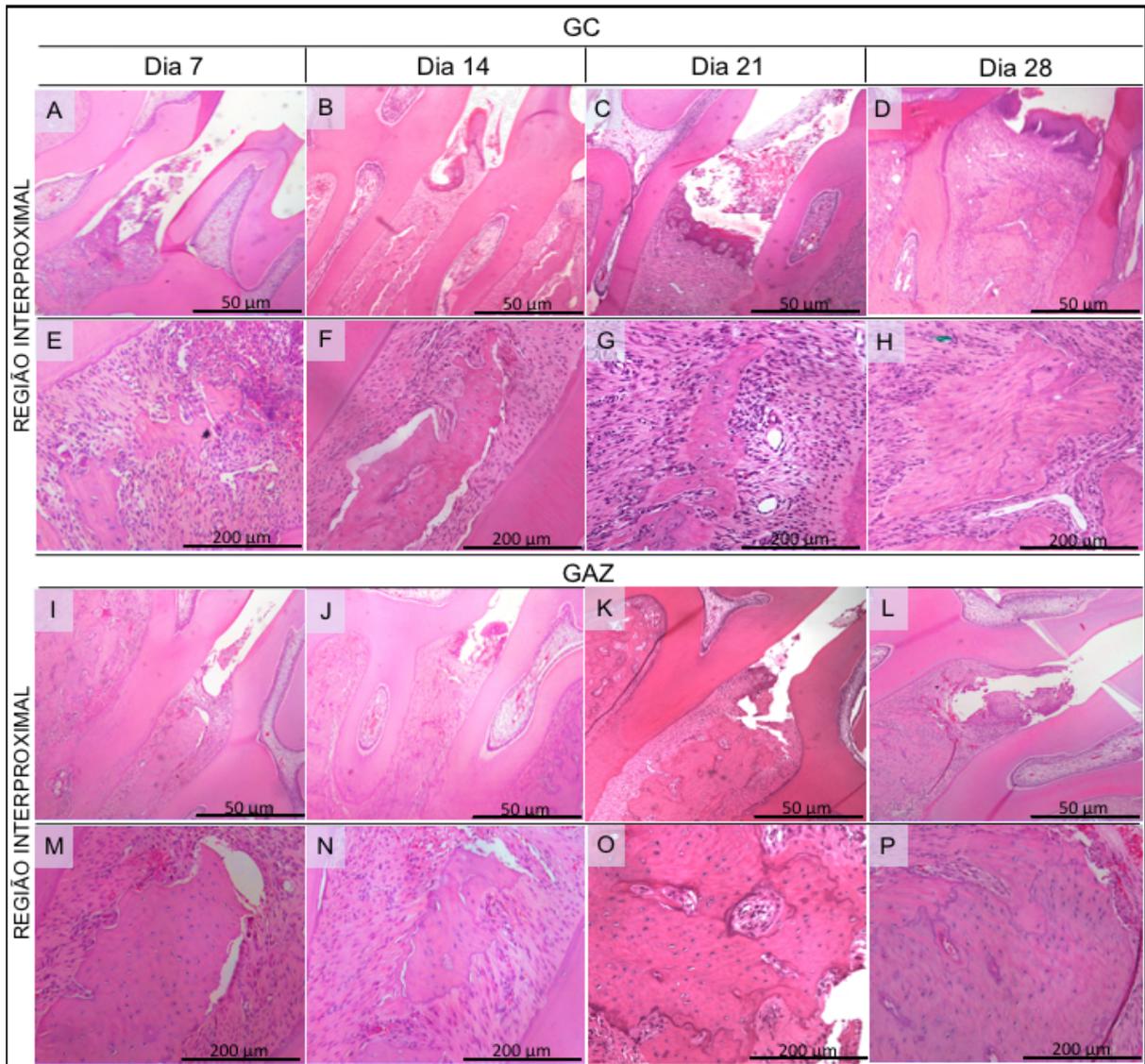
Legenda: A, B, C, D – Perfil celular da polpa dentária no Grupo controle (GC) não mostrando modificações no aspecto histológico nos dias 7, 14, 21 e 28 de MDI, respectivamente (Coloração HE, 200x). E, F, G, H – Perfil celular da polpa dentária no Grupo teste tratado com Ácido Zoledrônico (GAZ) não mostrando modificações no aspecto histológico nos dias 7, 14, 21 e 28 de MDI, respectivamente (Coloração HE, 200x).

**Figura 11:** Fotomicrografias longitudinais da região interproximal entre o 1º e 2º molar superior do lado não submetido a MDI no qual se avaliaram os fenômenos periodontais.



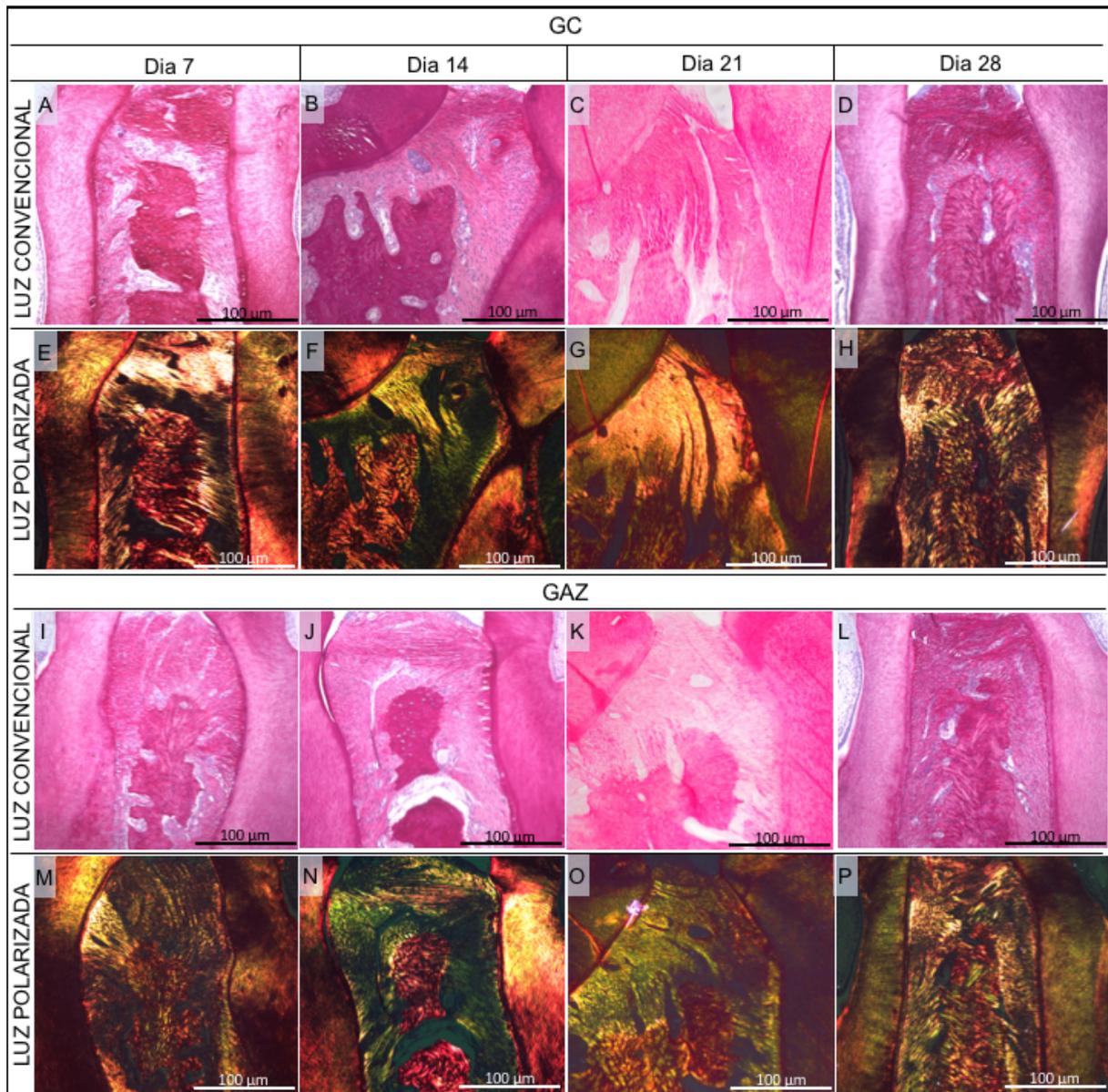
Legenda: A, B, C, D – Aspecto histológico do LP no Grupo controle (GC) não mostrando alterações nos dias 7, 14, 21 e 28, respectivamente (Coloração HE, 5x). E, F, G, H – Aspecto histológico do LP no Grupo controle (GC) não mostrando alterações nos dias 7, 14, 21 e 28, respectivamente (Coloração HE, 200x). I, J, K, L - Aspecto histológico do LP no Grupo teste tratado com Ácido Zoledrônico (GAZ) não mostrando alterações nos dias 7, 14, 21 e 28 de MDI, respectivamente (Coloração HE, 5x). M, N, O, P - Aspecto histológico do LP no Grupo teste tratado com Ácido Zoledrônico (GAZ) não mostrando alterações nos dias 7, 14, 21 e 28 de MDI, respectivamente (Coloração HE, 200x).

**Figura 12:** Fotomicrografias longitudinais da região interproximal entre o 1º e 2º molar superior do lado submetido a MDI no qual se avaliaram os fenômenos periodontais.



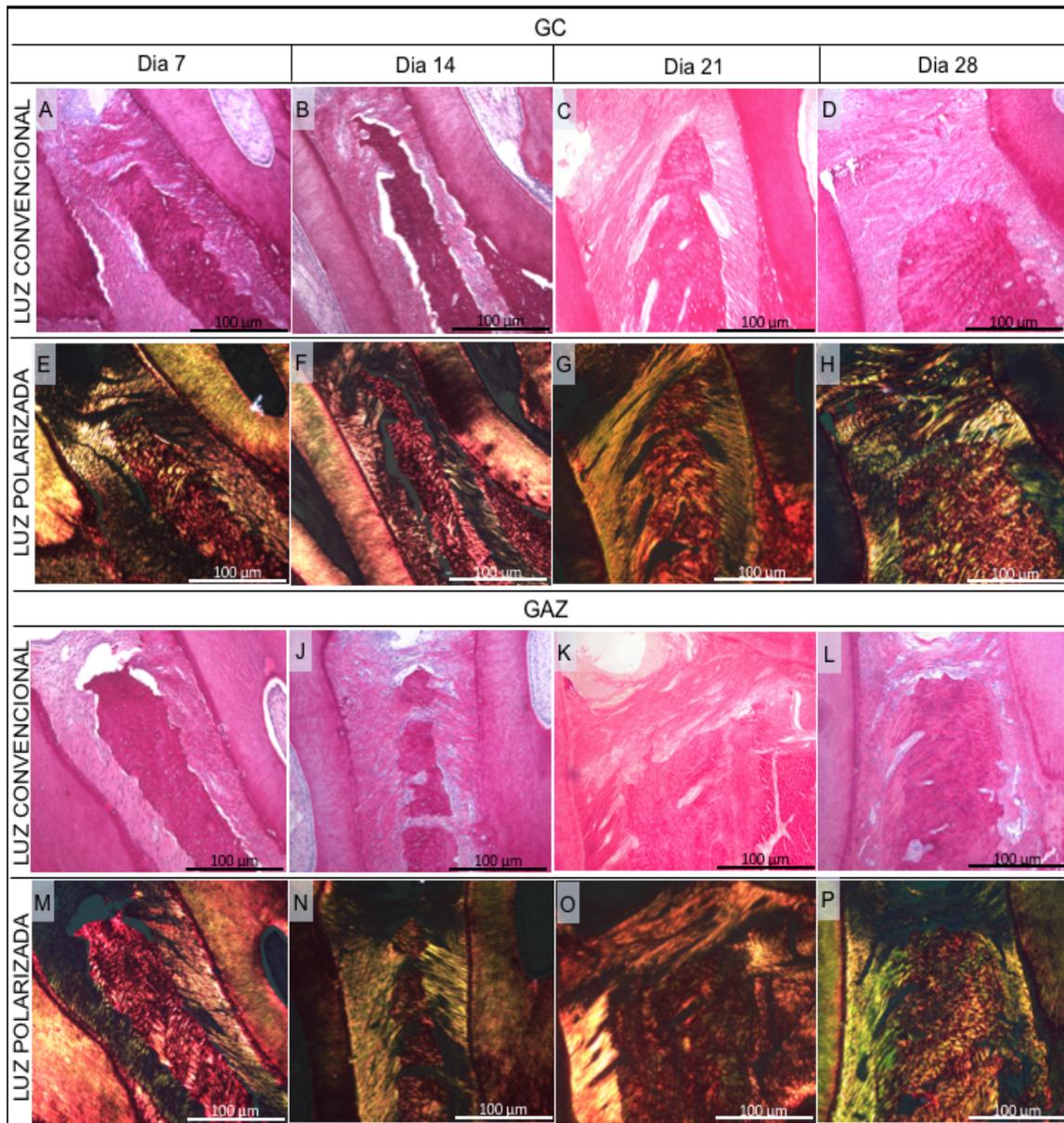
Legenda: A, B, C, D – Aspecto histológico do LP no Grupo controle (GC) mostrando alterações compatíveis com a MDI nos dias 7, 14, 21 e 28, respectivamente (Coloração HE, 5x). E, F, G, H – Aspecto histológico do LP no Grupo controle (GC) mostrando alterações compatíveis com a MDI nos dias 7, 14, 21 e 28, respectivamente (Coloração HE, 200x). I, J, K, L - Aspecto histológico do LP no Grupo teste tratado com Ácido Zoledrônico (GAZ) mostrando alterações compatíveis com a MDI nos dias 7, 14, 21 e 28 de MDI, respectivamente (Coloração HE, 5x). M, N, O, P - Aspecto histológico do LP no Grupo teste tratado com Ácido Zoledrônico (GAZ) mostrando alterações compatíveis com a MDI nos dias 7, 14, 21 e 28 de MDI, respectivamente (Coloração HE, 200x).

**Figura 13:** Fotomicrografia do perfil do colágeno na região do LP entre o 1º e 2º molar superior do lado não submetido a MDI.



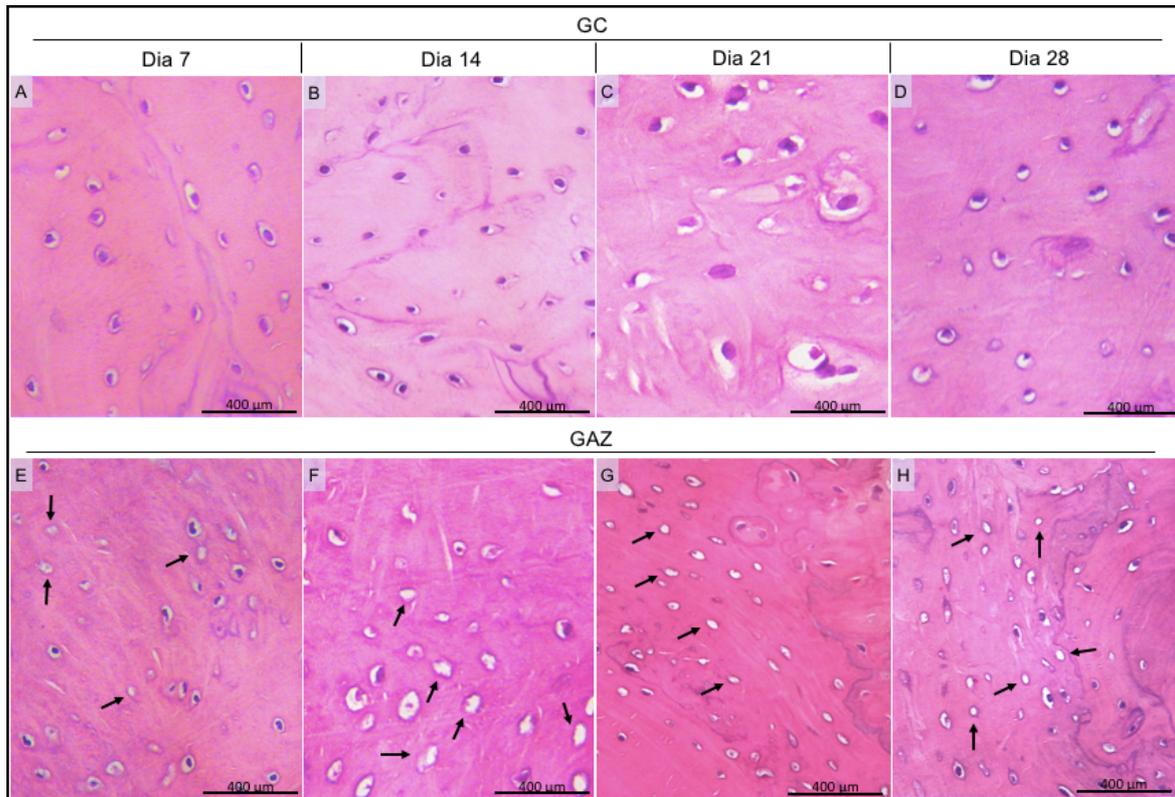
Legenda: A, B, C, D – Grupo controle (GC) mostrando colágeno total sem polarização de luz (Coloração Picosirius Red, 100x) nos dias 7, 14, 21 e 28. E, F, G, H – Grupo controle (GC) demonstrando birrefringência de colágeno amarelo-vermelhado (Tipo I) e verde-esbranquiçado (Tipo III) após polarização da luz. I, J, K, L - Grupo teste tratado com Ácido Zoledrônico (GAZ) mostrando colágeno total sem polarização de luz (Coloração Picosirius Red, 100x) nos dias 7, 14, 21 e 28. M, N, O, P - Grupo teste tratado com Ácido Zoledrônico (GAZ) demonstrando birrefringência de colágeno amarelo-vermelhado (Tipo I) e verde-esbranquiçado (Tipo III) após polarização da luz.

**Figura 14:** Fotomicrografia do perfil do colágeno na região do LP entre o 1º e 2º molar superior do lado submetido a MDI.



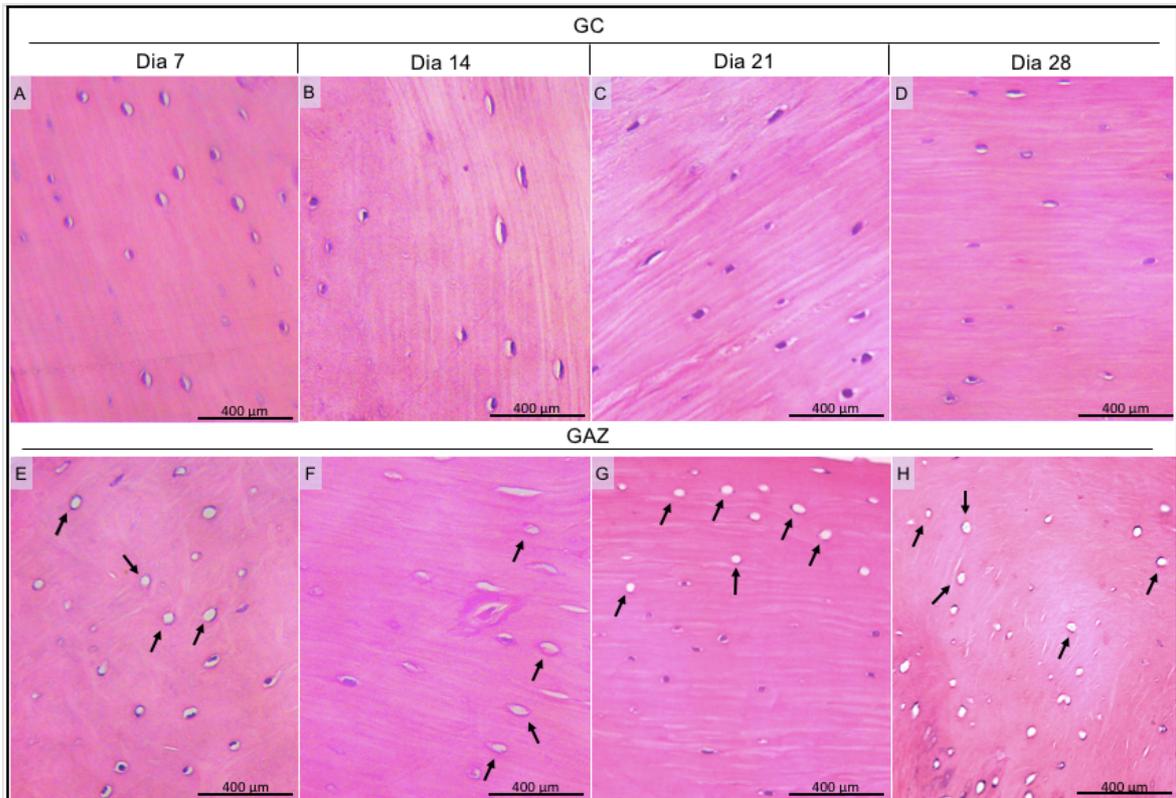
Legenda: A, B, C, D – Grupo controle (GC) mostrando colágeno total sem polarização de luz (Coloração Picrosirius Red, 100x) nos dias 7, 14, 21 e 28 de MDI, respectivamente. E, F, G, H – Grupo controle (GC) demonstrando birrefringência de colágeno amarelo-vermelhado (Tipo I) e verde-esbranquiçado (Tipo III) após polarização da luz. I, J, K, L - Grupo teste tratado com Ácido Zoledrônico (GAZ) mostrando colágeno total sem polarização de luz (Coloração Picrosirius Red, 100x) nos dias 7, 14, 21 e 28 de MDI, respectivamente. M, N, O, P - Grupo teste tratado com Ácido Zoledrônico (GAZ) demonstrando birrefringência de colágeno amarelo-vermelhado (Tipo I) e verde-esbranquiçado (Tipo III) após polarização da luz.

**Figura 15:** Fotomicrografias do tecido ósseo adjacente à área de inserção do MI.



Legenda: A, B, C, D – Grupo controle (GC) mostrando tecido ósseo vitalizado nos dias 7, 14, 21 e 28 de MDI, respectivamente (Coloração HE, 400x). E, F, G, H – Grupo teste tratado com Ácido Zoledrônico (GAZ) mostrando lacunas de osteócitos vazias nos dias 7, 14, 21 e 28 de MDI, respectivamente (Coloração HE, 400x).

**Figura 16:** Fotomicrografias do tecido ósseo distante da área de inserção do MI.



Legenda: A, B, C, D – Grupo controle (GC) mostrando tecido ósseo vitalizado nos dias 7, 14, 21 e 28 de MDI, respectivamente (Coloração HE, 400x). E, F, G, H – Grupo teste tratado com Ácido Zoledrônico (GAZ) mostrando lacunas de osteócitos vazias nos dias 7, 14, 21 e 28 de MDI (Coloração HE, 400x).

## 6 CONCLUSÃO GERAL

1. A administração do AZ interferiu no deslocamento dentário do 1ºMSE observada de forma macroscópica e microscópica;
2. O tecido pulpar não apresentou alterações histológicas decorrentes da MDI e nem de efeitos diretos do AZ;
3. O tecido periodontal demonstrou alterações exclusivamente em virtude da força ortodôntica aplicada, não sendo influenciado pelo tempo de movimentação;
4. Não foi observado efeito tóxico direto do AZ sobre o conteúdo de colágeno Tipo I e III, ocorrendo uma remodelação periodontal com a MDI apesar da administração do fármaco;
5. As características histológicas inflamatórias e cicatriciais do tecido ósseo de suporte do MI foram alteradas pelo AZ, sem a ocorrência de osteonecrose.

## 7 REFERÊNCIAS (INTRODUÇÃO GERAL)

AJWA, N. The role of bisphosphonates in orthodontic tooth movement - A review. **J Family Med Prim Care**, v.8, n.12, p.3783- 3788, 2019.

ALRAHABI, K.M.; GHABBANI, H. M. Clinical impact of bisphosphonates in root canal therapy. **Saudi Med J**, v.39, n.3, p.232-238, 2018.

ANTOSZEWSKA – SMITH, J.; SARUL, M.; ŁYCZEK, J.; KONOPKA, T.; KAWALA, B. Effectiveness of orthodontic miniscrew implants in anchorage reinforcement during en-masse retraction: A systematic review and meta-analysis. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, v.151, n.3, p.440-455, 2017.

ARAÚJO, T.M.; NASCIMENTO, M.H.A.; BEZERRA, F.; SOBRAL, M.C. Ancoragem esquelética em Ortodontia com miniimplantes. **Rev. Dental Press Ortodon. Ortop. Facial**, v.11, n.4, p.126-56, 2006.

ARIFFIN, S.H.Z.; YAMAMOTO, Z.; ABIDIN, I.Z.Z.; WAHAB, R.M.A.W.; ARIFFIN, Z.Z. Cellular and Molecular Changes in Orthodontic Tooth Movement. **Scientific World Journal**, v.11, p.1788-1803, 2011.

ASIRY, M.A. Biological aspects of orthodontic tooth movement: A review of literature. **Saudi J Biol Sci**, v.25, n.6, p.1027-1032, 2018.

BASSO, F.G.; TURRIONI, A.P.S.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C.A. Effects of zoledronic acid on odontoblast-like cells. **Arch Oral Biol.**, v.58, n.5, p.467-73, 2013.

BASSO, F.G.; SOARES, D.G.; PANSANI, T.N.; TURRIONI, A.P.S.; SCHEFFEL, D.L.; HEBLING, J.; COSTA, C.A.S. Response of a co-culture model of epithelial cells and gingival fibroblasts to zoledronic acid. **Braz Oral Res.**, v.30, n.1, p.1-7, 2016.

BIGUETTI, C.C.; OLIVA, A.H.; HEALY, K.; MAHMOUD, R.H.; CUSTÓDIO, I.C.; CONSTANTINO, D.H.; ERVOLINO, E.; DUARTE, M.A.H.; FAKHOURI, W.D.; MATSUMOTO, M.A. Medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senescent female mice treated with zoledronic acid: Microtomographic, histological and immunohistochemical characterization. **Plos One**, v.14, n.6, p.1-22, 2019.

BROOKS, P.J.; NILFOROUSHAN, D.; MANOLSON, M.F.; SIMMONS, C.A.; GONG, S.G. Molecular Markers of Early Orthodontic Tooth Movement. **Angle Orthodontist**, v. 79, n.6, p.1108-13, 2009.

BOWDEN, A.S.; MAHAN, J.D. Zoledronic acid in pediatric metabolic bone disorders. **Transl Pediatr.**, v.6, n.4, p.256-268, 2017.

BURSTONE, C.J. Rationale of the segmented arch. **Am J Orthod.**, v.48, p.805-22, 1962.

CHIARELLA, E.; CODISPOTI, B.; ANNAMARIA, A.; CONSENTINO, E.G.; SCICCHITANO, S.; MONTALCINI, Y.; LICO, D.; MORRONE, G.; MESURACA, M.; BOND, H.M. Zoledronic acid inhibits the growth of leukemic MLL-AF9 transformed hematopoietic cells. **Heliyon**, v.6, n.6, p.1-10, 2020.

CONSOLARO, A.; CONSOLARO, R.B. There is no pulp necrosis or calcific metamorphosis of pulp induced by orthodontic treatment: biological basis. **Dental Press J Orthod.**, v.23, n.4, p.36-42, 2018.

CVICK, B.; AGIS, H.; STÖGERER, K.; MORITZ, A.; WATZEK, G.; GRUBER, R. The response of dental pulp-derived cells to zoledronate depends on the experimental mode. **Int Endod J.**, v.44, n.1, p.33-40, 2011.

DAI, Q.; ZHOU, S.; ZHANG, P.; MA, X.; HA, N.; YANG, X.; YU, Z.; FANG, B.; JIANG, L. Force-induced increased osteogenesis enables accelerated orthodontic tooth movement in ovariectomized rats. **Sci Rep.**, v.7, n.3906, p.1-8, 2017.

DÀPUZZO, F.; CAPPABIANCA, S.; CIAVARELLA, D.; MONSURRÒ, A.; SILVESTRINI-BIAVATI, A.; PERILLO, L. Biomarkers of Periodontal Tissue Remodeling during Orthodontic Tooth Movement in Mice and Men: Overview and Clinical Relevance. **Scientific World Journal**, v.2013, p.1-8, 2013.

ESTANISLAU, I.M.G. **Modelo experimental de movimentação dentária induzida com ancoragem esquelética**: estudo morfológico. 2019. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, F. J.; CAÑIGRAL, A.; LÓPEZ-CABALLO, J. L.; BRIZUELA, A.; COBO, T.; DE CARLOS, F.; SUAZO, I.; PÉREZ-GONZÁLES, Y.; VEJA, J. A. Recombinant osteoprotegerin effects during orthodontic movement in a rat model. **Eur J Orthod.**, v.38, n.4, p.379-385, 2015.

FRACALOSSO A.C.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. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

FRACALOSSI, A.C.C.; SANTAMARIA, J.R.M.; CONSOLARO M.F.M.O.; CONSOLARO, A. Movimentação dentária experimental em murinos: período de observação e plano dos cortes microscópicos. **Rev. Dent. Press Ortodon. Ortop. Facial**, v.14, n.1, p.143-157, 2009.

FRANZONI, J.S.; SOARES, F.M.P.; ZANIBONI, E.; VEDOVELLO FILHO, M.; SANTAMARIA, M.P.; DOS SANTOS, G.M.T.; ESQUISATTO, M.A.M.; FELONATO, M.; MENDONCA, F.A.S.; FRANZINI, C.M.; SANTAMARIA JR, M. Zoledronic acid and alendronate sodium and the implications in orthodontic movement. **Orthod. Craniofac. Res.**, v.20, n.3, p.164-169, 2017.

GUAJARDO, G.; OKAMOTO, Y.; GOGEN, H.; SHANFELD, JL.; DOBECK, J.; HERRING, A.H.; DAVIDOVITCH, Z. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in cat paradental tissues during tooth movement. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, v.118, n.2, p.210-9, 2000.

GUDHIMELLA, S.; IBRAHIM, A.; KARANTH, D.; KLUEMPER, A.M.; WESTGATE, P.M.; PULEO, D.A.; HUJA, S.S. A rodent model using skeletal anchorage and low forces for orthodontic tooth movement. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, v.155, n.2, p.254-263, 2019.

GUTIÉRREZ-VIDAL, X.; CLAVEL-GÓMEZ, J.F.; CEPEDA-GAITÁN, L.A. Dental extraction following zoledronate, induces osteonecrosis in rat's jaw. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.22, n.2, p.177-84, 2017.

HEDAYATI, Z.; SHOMALI, M. Maxillary anterior en masse retraction using different antero-posterior position of mini screw: a 3D finite element study. **Prog Orthod.**, v.17, n.1, p.1-7, 2016.

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, 1979.

HORTOBAGYI, G.N.; ZHENG, M.; MOHANLAL, R. Indirect Evaluation of Bone Saturation with Zoledronic Acid After Long-Term Dosing. **Oncologist**, v. 24, n.2, p.178-184, 2019.

IGLESIAS-LINARES, A.; YÁÑEZ-VICO, R.M.; SOLANO-REINA, H.; TORRES-LAGARES, D.; MOLES, M.A.G. Influence of bisphosphonates in orthodontic therapy: Systematic review. **J Dent.**, v.38, n.8, p.603-11, 2010.

IZQUIERDO, C.M.; OLIVEIRA, M.G.; WEBER, J.B.B. Terapêutica com bisfosfonatos: implicações no paciente odontológico – revisão de literatura. **RFO**, v.16, n.3, p.347-352, 2011.

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

JIANG, P.; ZHANG, P.; MUKTHAVARAM, R.; NOMURA, N.; PINGLE, C.S.; TENG, D.; CHIEN, S.; GUO, F.; KESARI, S. Anti-cancer effects of nitrogen-containing bisphosphonates on human cancer cells. **Oncotarget**, v.7, n.36, p.57932-42, 2016.

KAIPATUR, N.R.; WU, Y.; ADEEB, S.; STEVENSON, T.R.; MAJOR, P. W.; DOSCHAK, M.R. Impact of bisphosphonate drug burden in alveolar bone during orthodontic tooth movement in a rat model: A pilot study. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, v.144, p.557-67, 2013.

KAIPATUR, N.; WU, Y.; ADEEB, S.; STEVENSON, T.; MAJOR, P.; DOSCHAK, M. A Novel Rat Model of Orthodontic Tooth Movement Using Temporary Skeletal Anchorage Devices: 3D Finite Element Analysis and In Vivo Validation. **International Journal of Dentistry**, v.2014, p.1-11, 2014.

KAMEYAMA, T.; MATSUMOTO, Y.; WARITA, H.; OTSUBO, K.; SOMA, K. A Mechanical stress model applied to the rat periodontium: using controlled magnitude and direction of orthodontic force with an absolute anchorage. **Oral Med Pathol.**, v.7, p. 1-7, 2002.

KAWAZOE, A.; INUBUSHI, T.; MIYAUCHI, M.; ISHIKADO, A.; TANAKA, E.; TANNE, K.; TAKATA, T. Orally Administered Liposomal Lactoferrin Inhibits Inflammation - Related Bone Breakdown Without Interrupting Orthodontic Tooth Movement. **J Periodontol.**, v.84, n.10, 2013.

KEINAN, D.; COHEN, R.E. The Significance of Epithelial Rests of Malassez in the Periodontal Ligament. **J Endod.**, v.39, n.5, p.582-7, 2013.

KHAN, B.I.; SINGARAJU, G.S.; MANDAVA, P.; REDDY, G.V.; NETTAM, V.; BHAVIKATI, V.N. Comparison of Anchorage Pattern under Two Types of Orthodontic Mini- Implant Loading During Retraction in Type A Anchorage Cases. **J Clin Diagn Res.**, v.10, n.10, p.98-102, 2016.

KITAURA, H.; KIMURA, K.; ISHIDA, M.; SUGISAWA, H.; KOHARA, H.; YOSHIMATSU, M.; TAKANO-YAMAMOTO, T. Effect of Cytokines on Osteoclast Formation and Bone Resorption during Mechanical Force Loading of the Periodontal Membrane. **Scientific World Journal**, v.2014, p.1-7, 2014.

KRISHNAN, S.; PANDIAN, S.; KUMAR, A. Effect of Bisphosphonates on Orthodontic Tooth Movement - An Update. **J Clin Diagn Res.**, v.9, n.4, p. 1-5, 2015.

LI, Y.; JACOX, L.A.; LITTLE, S.H.; KO, C.C.; Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications. **Kaohsiung J Med Sci.**, v.34, n.4, p. 207-214, 2018.

LI, Z.; YU, M.; JIN, S.; WANG, Y.; LUO, R.; HUO, B.; LIU, D.; HE, D.; ZHOU, Y.; LIU, Y. Stress Distribution and Collagen Remodeling of Periodontal Ligament During Orthodontic Tooth Movement. **Front Pharmacol.**, v.10, p.1-8, 2019.

LIU, H.; WANG, S-H.; CHEN, S-C.; CHEN, C-Y.; LIN, T-M. Zoledronic acid blocks the interaction between breast cancer cells and regulatory T-cells. **BMC Cancer**, v.19, n.1, p.1-13, 2019.

MARIGO, G.; ELIAS, C.N.; MARIGO, MARCELO. Surface analysis of 2 orthodontic mini-implants after clinical use. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, v.150, p.89-97, 2016.

MARTINS-ORTIZ, M.F. **Influência dos bisfosfonatos na movimentação dentária induzida, na frequência e nas dimensões das reabsorções radiculares associadas.** 2004. 187 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MARZANO-MORENO, F.J.; TORRECILLAS, J.R.; MELGUIZO-RODRÍGUEZ, L.; ILLESCAS-MONTES, R.; RUIZ, C.; GARCÍA-MARTÍNEZ, O. Bisphosphonate Modulation of the Gene Expression of Different Markers Involved in Osteoblast Physiology: Possible Implications in Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw. **Int J Med Sci.**, v.15, n.4, p.359-367, 2018.

MASSARO, C.S.; CONSOLARO, R.B.; SANTAMARIA JR, M.; CONSOLARO, M.F.M.O, CONSOLARO, A. Analysis of the dentin-pulp complex in teeth submitted to orthodontic movement in rats. **J Appl Oral Sci.**, v.17, p.35-42, 2009.

MERCATALI, L.; SCARPI, E.; SERRA, P.; FABBRI, F.; RICCI, R.; LIVERANI, C.; ZANONI, M.; ZOLI, W.; MALTONI, R.; GUNELLI, E.; AMADORI, D.; IBRAHIM, T. RANK/RANK-L/OPG in Patients with Bone Metastases Treated with Anticancer Agents and Zoledronic Acid: A Prospective Study. **Int J Mol Sci.**, v.14, n.6, p.10683-10693, 2013.

NOVA, M.F.P.; CARVALHO, F.R.; ELIAS, C.N.; ARTESE, F. Avaliação do torque para inserção, remoção e fratura de diferentes mini-implantes ortodônticos. **Rev. Dental Press Ortodon. Ortop. Facial**, v.13, n.5, p.76-87, 2008.

ORTEGA, A.J.; CAMPBELL, P.M.; HINTON, R.; NAIDU, A.; BUSCHANG, P.H. Local application of zoledronate for maximum anchorage during space closure. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, v.142, n.6, p.780-91, 2012.

PROFFIT, W.R.; FIELDS, H.W.; SARVER, J.D.M. **Ortodontia contemporânea**; [tradução. Rodrigo Melo do Nascimento et al.] - Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

RAMAZANZADEH, B.A.; SAHHAFIAN, A.A.; MOHTASHAM, N.; HASSANZADEH, N.; JAHANBIN, A.; SHAKERI, M.T. Histological changes in human dental pulp following application of intrusive and extrusive orthodontic forces. **J Oral Sci.**, v.51, n.1, p.109-115, 2009.

RANGIANI, A.; JING, Y.; REN, Y.; YADAV, S.; TAYLOR, R.; FENG, J.Q. Critical roles of periostin in the process of orthodontic tooth movement. **Eur J Orthod.**, v.38, n.4, p.373-8, 2016.

REDDY, L.M.; REDDY, K.J.; REDDY, P.R. A simple RP-HPLC method for related substances of zoledronic acid in pharmaceutical products. **Arabian J. of Chemistry**, v.10, p.196-204, 2017.

RUAN, M.J.; CHEN, G.; XU, T.M. Comparison of orthodontic tooth movement between adolescents and adults based on implant superimposition. **Plos one**, v.13, n.5, p.1-14, 2018.

SANTAMARIA JR, M.; MILAGRES, D.; IYOMASA, M.M.; STUANI, M.B.S.; RUELLAS, A.C.O. Initial pulp changes during orthodontic movement: histomorphological evaluation. **Braz Dent J.**, v.18, n.1, p.34-9, 2007.

SANTOS, R.M.C.; TORRES, C.B.B. Papel do sistema RANKL/RANK/OPG como regulador-chave da remodelação óssea durante a movimentação ortodôntica. **Jorn. Inter. Bioc.**, v.2, n.1, p.31-34, 2017.

SCHEPER, M.A.; BADROS, A.; CHAISUPARAT, R.; CULLEN, K.J.; MEILLER, T.F. Effect of Zoledronic Acid on Oral Fibroblasts and Epithelial Cells: A Potential Mechanism of Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis. **Br J Haematol.**, v.144, n.5, p.667-76, 2009.

SHOJI-MATSUNAGA, A.; ONO, T.; HAYASHI, M.; TAKAYANAGI, H.; MORIYAMA, K.; NAKASHIMA, T. Osteocyte regulation of orthodontic force-mediated tooth movement via RANKL expression. **Sci Rep.**, v.7, n.1, p.1-9, 2017.

SCHÖDER, A.; BAUER, K.; SPANIER, G.; PROFF, P.; WOLF, M.; KIRSCHNECK, C. Expression kinetics of human periodontal ligament fibroblasts in the early phases of orthodontic tooth movement. **J Orofac Orthop.**, v.79, n.5, p.337-351, 2018.

SILVA, P.G.B.; FERREIRA JÚNIOR, A.E.C.; TEÓFILO, C.R.; BARBOSA, M.C.; JÚNIOR, R.C.P.L.; SOUSA, F.B.; MOTA, M.R.L.; RIBEIRO, R.A.; ALVES, A.P.N.N. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Archives of Oral Biology**, v.60, p.1237-45, 2015.

SILVA E SILVA, B.; FAGUNDES, N.C.F.; NOGUEIRA, B.C.L.; NETO, J.V.; NORMANDO, D.; LIMA, R.R. Epithelial rests of Malassez: from latent cells to active participation in orthodontic movement. **Dental Press J Orthod.**, v. 22, n.3, p.119-125, 2017.

SOARES, A.P.; ESPÍRITO SANTO, R.F.; LINE, S.R.P.; PINTO, M.G.F.; SANTOS, P.M.; TORALLES, M.B.P.; ESPÍRITO SANTO, A.R. Bisphosphonates: pharmacokinetics, bioavailability, mechanisms of action, clinical applications in children, and effects on tooth development. **Environ Toxicol Pharmacol.**, v.42, p.212-7, 2016.

STELLER, D.; HERBST, N.; PRIES, R.; JUHL, D.; HAKIM, S.G. Positive impact of platelet-rich plasma and Platelet-rich fibrin on viability, migration and proliferation of osteoblasts and fibroblasts treated with zoledronic acid. **Sci Rep.**, v.9, n.1, p.1-11, 2019.

TALIC, N.F.; EVANS, C.A.; DANIEL, J.C.; ZAKI, A.E. Proliferation of epithelial rests of Malassez during experimental tooth movement. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, v.123, n.5, p.527-33, 2003.

TATLI, U.; USTÜN, Y.; KÜRKÇÜ, M.; BENLIDAYI, M.E. Effects of Zoledronic Acid on Physiologic Bone Remodeling of Condylar Part of TMJ: A Radiologic and Histomorphometric Examination in Rabbits. **Scientific World Journal**, p.1-6, 2014.

VENKATARAMANA V.; CHIDAMBARAM S.; REDDY B.V.; GOUD E.V.; ARAFATH M.; KRISHNAN S. Impact of Bisphosphonate on Orthodontic tooth movement and osteoclastic count: An Animal Study. **J Int Oral Health**, v.6, n.2, p.1-8, 2014.

WALTER, C.; KLEIN, M.O.; PABST, A.; AL-NAWAS, B.; DUSCHNER, H.; ZIEBART, T. Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. **Clin Oral Investig.**, v.14, n.1, p.35-41, 2010.

WANG, Q.; LIU, J.; GUO, T.; LIU, D.; PAN, J. Epidermal Growth Factor Reverses the Inhibitory Effects of the Bisphosphonate, Zoledronic Acid, on Human Oral Keratinocytes and Human Vascular Endothelial Cells In Vitro via the Epidermal Growth Factor Receptor

(EGFR)/Akt/Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) Signaling Pathway. **Med Sci Monit.**, v. 25, p.700-710, 2019.

WANG, L.; FANG, D.; XU, J.; LUO, R. Various pathways of zoledronic acid against osteoclasts and bone cancer metastasis: a brief review. **BMC Cancer**, v.20, n.1, p.1-10, 2020.

XIONG, J.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P.M. Role of the epithelial cell rests of Malassez in the development, maintenance and regeneration of periodontal ligament tissues. **Periodontol 2000**, v.63, n.1, p.217-33, 2013.

YANG, L.; DU, S. Efficacy and Safety of Zoledronic Acid and Pamidronate Disodium in the Treatment of Malignant Skeletal Metastasis. **Medicine (Baltimore)**, v.94, n.42, p. 1-7, 2015.

ZAGO, P.M.W.; SOUSA, I.M.O.; SERVAT-MEDINA, L.; JORGE, M.P.; NETO, L.G.L.; HASS, V.; LI, X.; RUIZ, A.L.T.G.; SAXENA, D.; FOGLIO, M.A. Standardized *Arrabidaea chica* Extract Shows Cytoprotective Effects in Zoledronic Acid-Treated Fibroblasts and Osteoblasts. **Clin Cosmet Investig Dent.**, v.12, p.327-333, 2020.