

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

GIOVANNI MODESTO VIEIRA

**O EFEITO DA TETRACICLINA MODIFICADA E SINVASTATINA NA RECIDIVA DA
MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA NO LIGAMENTO PERIODONTAL DE RATOS**

**BRASÍLIA-DF
MARÇO 2015**

GIOVANNI MODESTO VIEIRA

**O EFEITO DA TETRACICLINA MODIFICADA E SINVASTATINA NA RECIDIVA DA
MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA NO LIGAMENTO PERIODONTAL DE RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Rivadávio Fernandes Batista Amorim

BRASÍLIA-DF

MARÇO 2015

Vieira Modesto, Giovanni

O efeito da tetraciclina modificada e sinvastatina na recidiva da movimentação dentária no ligamento periodontal de ratos – Brasília, março de 2015.

Nº de páginas 124

Área de concentração: Ciências Médicas, Odontologia, Ortodontia.

Orientador: Prof. Dr. Rivadávio Fernandes Batista Amorim.

Tese de DOUTORADO–Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília-UnB-Brasília-D. F.

1.Recidiva; 2. Tetraciclina; 3. Sinvastatina

Nome: Giovanni Modesto Vieira

Título: O efeito da tetraciclina modificada e sinvastatina na recidiva da movimentação dentária no ligamento periodontal de ratos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, para obtenção do título de Doutor.

Aprovado em 23 de março de 2015

Banca Examinadora

Prof. Dr. Maurício Barriviera

Instituição: Universidade Católica de Brasília

Prof. Dr. Wagner Rodrigues Duarte

Instituição: Universidade de Brasília

Prof. Dr. Mustapha Amad Neto

Instituição: Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior

Instituição: Universidade Federal Sergipe

Prof. Dr. Rivadávio Fernandes Batista Amorim

Instituição: Universidade de Brasília

Ao Deus altíssimo e ao Mestre Jesus, por me darem a possibilidade de estudar...

A minha esposa Paola, e aos meus filhos Viviani e Lucas, pelo tempo que deixamos de estar juntos...
Aos meus pais, Fernando (In Memoriam) e Gione, por me conscientizarem que a educação é o único caminho...

AGRADECIMENTOS

Ao Funcionário Edivaldo Batista Teles e Adriana Xavier da Silva pela ajuda inestimável, sem o qual este trabalho não se concretizaria.

Ao Professor Willias Machocha, Head of Department of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Pharmacy, University of Kuwait, pelo auxílio na aquisição da droga inciclinida-CMT-3 (tetraciclina modificada), bem como no auxílio do preparo da carboximetilcelulose.

A empresa francesa Galderma^R S.A. pela doação da droga inciclinida CMT 3, bem como à senhora Isabelle Pelisson pela gentileza expressa nos inúmeros e-mails e contatos estabelecidos.

A empresa brasileira Morelli S.A. pela fabricação exclusiva e doação do fio de amarrilho 0,14mm, bem como a doação das molas de níquel-titânio utilizadas nos testes de ensaios clínicos.

A Professora Vânia Maria Moraes Ferreira e a aluna de Mestrado Melissa Sousa de Assis, pelo auxílio na realização da gavagem oral nos animais experimentais.

Ao Professor Laudimar Alves de Oliveira pela concessão de utilização do seu laboratório na Odontologia para a instalação dos dispositivos de movimentação dentária.

Ao Professor Dr. Sacha Braun Chaves, do laboratório de Genética e Morfologia, pelo auxílio e orientação na utilização do micro tomógrafo.

Ao aluno de Doutorado Osmar Nascimento Silva, da Universidade Católica de Brasília, pelo auxílio na realização das soluções medicamentosas.

Ao Professor Dr. Ângelo Henrique de Lira Machado, do laboratório de Química Orgânica da Universidade de Brasília, pelo auxílio na destilação da N-2 metilpirrolidona.

Ao Professor Dr. Rivadávio Fernandes Batista Amorim pela orientação deste trabalho.

Aos meus colegas de pós-graduação que tornaram um período de longa dedicação em algo prazeroso.

“A leitura após certa idade distrai excessivamente o espírito humano das suas reflexões criadoras. Todo o homem que lê demais e usa o cérebro de menos adquire a preguiça de pensar.”

Albert Einstein.

RESUMO

O efeito da Tetraciclina modificada e sinvastatina na recidiva da movimentação dentária no ligamento periodontal de ratos

Introdução: A recidiva dentária após o tratamento ortodôntico tem um enorme impacto na clínica ortodôntica, em especial a recidiva imediata, afetando os benefícios da terapêutica ortodôntica. Os dispositivos de contenção fixa não permitem a inibição da recidiva dentária, devido à ocorrência da remodelação óssea ativa após a remoção dos aparelhos ortodônticos, que dependem das enzimas metaloproteinases para a sua presença. Algumas drogas podem atuar na inibição das metaloproteinases e inibir a recidiva dentária. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi de avaliar o efeito da tetraciclina modificada quimicamente CMT-3 (inciclinida) e sinvastatina na recidiva da movimentação dentária em ratos através de um novo método por micro CT, bem como a correlação da densidade mineral óssea com a recidiva dentária. **Material e Métodos:** Quarenta ratos adultos e machos, da variedade Wistar, com massa de 354 +/- 33 gramas, foram separados em três grupos, sendo um grupo controle com 10 animais e dois grupos experimentais com 15 animais, e tiveram molas de aço inoxidável instaladas no primeiro molar superior esquerdo. Os molares murinos foram movimentados em direção mesial durante 18 dias (desprezando a movimentação dos incisivos em direção distal), e após a remoção das molas, foram aplicadas por gavagem oral: 30mg/kg de inciclinida e 5mg/kg de sinvastatina nos dois grupos experimentais, e carboximetilcelulose a 0,5% no grupo controle, durante 20 dias. Foram realizadas três aquisições microtomográficas: a primeira aquisição após a instalação das molas, a segunda aquisição após 18 dias de movimentação dentária, e a terceira aquisição após a remoção das molas no décimo oitavo dia e término da instituição do regime de tratamento das drogas durante vinte dias, no trigésimo oitavo dia. A recidiva dentária foi visualizada com o auxílio de microtomógrafo CT, e as 120 imagens reconstruídas e escolhidas por intermédio dos softwares N-Recon- 1.6.9.4, e Data Viewer 1.5.0.0 (referentes às três aquisições microtomográficas com 40 animais dos três grupos), tiveram as suas guias de mensuração realizadas (correspondentes a duas retas tangentes as face de maior convexidade: distal do primeiro molar superior esquerdo e mesial do segundo molar, perpendiculares ao plano oclusal destes dentes, e mensuradas pela união destas duas retas) e aferida pelo software Image Pro^R plus 5.1, e comparadas por Kruskal-Wallis e teste pós-hoc de Dunn através de SPSS-22. Após o sacrifício dos animais, foi mensurada a densidade mineral óssea e a unidade Hounsfield por micro-CT, do osso alveolar adjacente à raiz mesial e distal do primeiro molar movimentado (em uma área ROI circular de 60 x 60 pixels previamente escolhida) através do software CT Analyser 1.13, e analisada por ANOVA com pós-hoc de Tukey no SPSS-22. A correlação entre a recidiva dentária e a densidade mineral óssea foi analisada por teste de Spearman. **Resultados:** O presente trabalho permitiu uma melhor acurácia da mensuração da recidiva dentária, em relação aos métodos tradicionais de moldagem, transferência de dados e aferição. A recidiva foi menor no grupo experimental da inciclinida em relação ao grupo controle ($p=0,048$), e foi encontrada significância estatística ($p=0,007$) entre a droga inciclinida e o grupo controle. A droga sinvastatina não inibiu a recidiva dentária com a posologia empregada. Ocorreu uma diminuição da densidade mineral óssea e da unidade Hounsfield adjacente à raiz mesial e distal no grupo da sinvastatina durante a recidiva dentária. A densidade mineral óssea e a unidade Hounsfield diminuíram na região óssea adjacente à raiz distal, e aumentaram na região óssea adjacente à raiz mesial do grupo da inciclinida durante a recidiva dentária. Não foi achada correlação entre a densidade mineral óssea e a recidiva dentária no osso alveolar da raiz mesial ($p=0,282$) e do osso alveolar da raiz distal ($p=0,061$). **Conclusões:** A droga CMT-3 inciclinida inibiu a recidiva da movimentação dentária em ratos. A droga sinvastatina não inibiu a recidiva dentária em ratos.

Descritores: recidiva, tetraciclina, sinvastatina, metaloproteinases, tomógrafos computadorizados, densitometria.

ABSTRACT

The effect of Tetracycline modified and simvastatin on relapse of tooth movement in periodontal ligament of the rats

Introduction: the dental orthodontic treatment after recurrence has a huge impact on orthodontic clinic, in particular the immediate relapse, affecting the benefits of orthodontic therapy. Fixed containment devices do not allow dental recurrence inhibition due to the occurrence of active bone remodeling upon removal of orthodontic appliances, which depend on the enzymes for their presence. Metalloproteinases Some drugs may act on inhibition of Metalloproteinases and inhibit dental recurrence. **Objectives:** the objective of this study was to evaluate the effect of chemically modified tetracycline CMT-3 (incyclinide) and simvastatin on relapse of tooth movement in rats using a new method for micro CT as well as the correlation of bone mineral density with tooth recurrence. **Material and methods:** forty rats adults and males, of variety, with mass of Wistar 354 +/- 33 grams, were divided into three groups, being a control group with 10 animals and two experimental groups with 15 animals, and stainless steel springs were installed on the upper left first molars. Murinos molars were moved toward mesial during 18 days (disregarding the movement of incisors in distal direction), and after removing the springs, were applied by oral gavage: 30 mg/kg of incyclinide and 5 mg/kg of simvastatin in two experimental groups, and carboxymethylcellulose the 0.5 in the control group, for 20 days. Three were carried out microtomography acquisitions: the first acquisition after installation of the springs, the second acquisition after 18 days of tooth movement, and the third acquisition after removal of the springs in the eighteenth day and ending the institution of drug treatment regimen for twenty days, in the thirty-eighth day. Dental recurrence was visualized with the aid of microtomography CT, and the 120 images reconstructed and chosen through the software N-Recon-1.6.9.4, and Data Viewer 1.5.0.0 (related to three microtomography acquisitions with 40 animals of three groups), had their measurement guides carried out (corresponding to the two tangent lines the face of greatest convexity: the left upper first molars distal and mesial of the second molar, perpendiculars to the occlusal plane of these teeth, and measured by the union of these two straight) and checked by the software Image Pro^R plus 5.1, and compared by Kruskal and Post-hoc test valid Dunn through SPSS-22. After the sacrifice of animals was measured bone mineral density and Hounsfield unit for micro-CT, the alveolar bone adjacent to the mesial and distal root of the busy first molars (in an area 60 x 60 circular ROI pixels previously chosen) through software CT Analyzer 1.13, and analyzed by ANOVA with Post-hoc Turkey in SPSS-22. The correlation between dental recurrence and bone mineral density was analyzed by Spearman test. **Results:** the present worked allowed a better measurement of dental recurrence, compared to traditional methods of molding, data transfers and scouting. The recurrence was lower in the experimental group of incyclinide in relation to the control group ($p=0,048$), and statistical significance was found ($p=0,007$) between the drug incyclinide and the control group. The drug simvastatin inhibited not dental recurrence with the dosage employed. There has been a decrease in bone mineral density and Hounsfield unit adjacent to the mesial and distal root in the simvastatin group during dental recurrence. Bone mineral density and Hounsfield unit decreased in the region adjacent to the distal root, and have increased in the region adjacent to the mesial root of the group of the incyclinide during the dental relapse. No correlation was found between bone mineral density and recurrence in dental alveolar bone of the mesial root ($p= -0,282$) and the alveolar bone of the distal root ($p= 0,061$). **Conclusions:** the drug CMT-3 incyclinide inhibited the relapse of tooth movement in rats. The drug simvastatin inhibited not dental recurrence in rats.

Key words: recurrence, tetracycline, simvastatin, metalloproteinase, tomography computadorized, densitometry.

LISTA DE SIGLAS

ANOVA – análise de variância
BMD- densidade mineral óssea
BMP-2 – proteína morfogenética do osso 2
cm- centímetros
CMC- carboximetilcelulose
CMTs- tetraciclinas modificadas quimicamente
CMT-1- tetraciclina 4-dedimetilamino
CMT-3- sanclina 4- dedimetilamino ou inciclinida
CMT-5- pirazole tetraciclina
CMT-7- tetraciclina 12a-dehidroxi-4-dedimetilamino
CMT-8- doxiciclina 4-dodedilamino
COX-2- enzima cicloxigenase 2
g- grama
GGT-1- geranylgeranyl transferase 1
GTPases- trifosfato de guanidina celular
HMG-CO-A- 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase
iNO- enzima óxido nítrico sintetase
kV-quilovolts
LGR-7- receptor de relaxina 1
LGR-8- receptor de relaxina 2
mm- milímetro
m/v- massa por volume
mg/kg- massa por quilograma
MMPs-metaloproteinases
MMP-1- metaloproteinase da matriz- colagenase 1
MMP-2- metaloproteinase da matriz- gelatinase 2
MMP-3- metaloproteinase da matriz- estromelisina 1
MMP-8- metaloproteinase da matriz- colagenase 8
MMP-9- metaloproteinase da matriz- gelatinase 9
MMP-12- metaloproteinase da matriz- metaloelastase
NF-Kb- fator nuclear kappa b
NiTi- níquel titânio
OPG- osteoprotegerina
qPCR- reação em cadeia da polimerase em tempo real
Rac- proteína lamelipodia
RANK- receptor de ativação nuclear kappa B
RANKL- receptor ativador kappa ligante

Recon- reconstruída

Rnam- ácido ribonucleico mensageiro

Rho- proteína da família do trifosfato de guanidina celular

SPSS- software pacote estatístico para ciências sociais

TIMPs- inibidores teciduais de metaloproteinases

μ L- microlitros

Σ - somatório

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -ANIMAIS DA AMOSTRA.....	36
FIGURA 2 -MESA OPERATÓRIA.....	38
FIGURA 3 -NSTALAÇÃO E CONTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	38
FIGURA 4 -PROCEDIMENTOS DE INSTALAÇÃO DAS MOLAS.....	40
FIGURA 5 -TETRACICLINA MODIFICADA GALDERMA ^R	43
FIGURA 6 -CARBOXIMETILCELULOSE.....	44
FIGURA 7 -PESAGEM SEMANAL DOS ANIMAIS.....	45
FIGURA 8 -MICROTOMÓGRAFO SKYSCAN 1076.....	46
FIGURA 9 -AQUISIÇÃO DE IMAGENS.....	47
FIGURA 10 -IMAGENS RECONSTRUÍDAS.....	49
FIGURA 11 -IMAGENS RECONSTRUÍDAS SELECIONADAS.....	50
FIGURA 12 -CONFECÇÃO DAS GUIAS DE MENSURAÇÃO.....	52
FIGURA 13 -MENSURAÇÃO DO MOVIMENTO DENTÁRIO.....	54
FIGURA 14 -DELINEAMENTO DA REGIÃO PARA DENSITOMETRIA.....	55
FIGURA 15 -MENSURAÇÃO DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA.....	55
FIGURA 16 -MENSURAÇÃO DA UNIDADE HOUNSFIELD.....	56
FIGURA 17 -TOMADAS MICROTOMOGRÁFICAS COM MOLA.....	61
FIGURA 18 -MÉDIA MOVIMENTAÇÃO DAS IMAGENS RECONSTRUÍDAS.....	63
FIGURA 19 -MÉDIA MOVIMENTAÇÃO DAS IMAGENS MICRO TC.....	63
FIGURA 20 -GRÁFICO DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA DA RAIZ MESIAL.....	67
FIGURA 21 -GRÁFICO DA UNIDADE HOUNSFIELD DA RAIZ MESIAL.....	67
FIGURA 22 -GRÁFICO DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA DA RAIZ DISTAL.....	68
FIGURA 23-GRÁFICO DA UNIDADE HOUNSFIELD DA RAIZ DISTAL.....	69
FIGURA 24-GRÁFICOS BOX PLOT DA RECIDIVA E DA DENSIDADE.....	70
FIGURA 25 -ANIMAL EXPERIMENTAL.....	103
FIGURA 26 -TESTE DAS MOLAS DE NÍQUEL-TITÂNIO.....	105
FIGURA 27 -FALHA NA RETENÇÃO DAS MOLAS.....	106

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS.....	66
TABELA 2 -DADOS DA RECIDIVA DENTÁRIA	71
TABELA 3 -DADOS DA RECIDIVA DENTÁRIA	71
TABELA 4 -CORRELAÇÃO ENTRE RECIDIVA E DENSIDADE ÓSSEA.....	72
TABELA 5-MÉDIA DE MASSA DOS ANIMAIS.....	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	ETIOLOGIA DA RECIDIVA DENTÁRIA	20
2.2	DROGAS QUE PODEM INIBIR A RECIDIVA DENTÁRIA	23
2.2.1	OSTEOPROTEGERINA	23
2.2.2	SINVASTATINA	24
2.2.3	BISFOSFONATOS	27
2.2.4	RELAXINA	28
2.2.5	TETRACICLINA MODIFICADA QUIMICAMENTE	30
2.3	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVO	32
4	MATERIAL E MÉTODO	33
4.1	DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA	35
4.2	ANESTESIA DOS ANIMAIS	36
4.3	MOVIMENTAÇÕES DENTÁRIAS INDUZIDAS	36
4.4	DIETA ESPECÍFICA	42
4.5	REGIME DE TRATAMENTO	42
4.6	AQUISIÇÕES DE IMAGENS	46
4.7	AVALIAÇÕES MICROTOMOGRÁFICAS	47
4.8	QUANTIFICAÇÕES DO MOVIMENTO DENTÁRIO	48
4.9	DENSITOMETRIA ÓSSEA	54
4.10	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	56
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
5	RESULTADOS	60
5.1	CORTES E RECONSTRUÇÕES TOMOGRÁFICAS	61
5.2	GUIAS DE MENSURAÇÃO	62
5.3	MÉTODOS DE MENSURAÇÃO	62
5.4	IMAGENS MENSURADAS	62
5.5	DADOS DAS MENSURAÇÕES DA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA	64
5.6	IMAGENS RECONSTRUÍDAS DA DENSITOMETRIA	65
5.7	DADOS DAS MENSURAÇÕES DA DENSITOMETRIA	65
5.8	ALTERAÇÕES DO PESO DOS ANIMAIS	72
6	DISCUSSÃO	74
7	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS	86
	APÊNDICE DE TABELAS DE DADOS 1	94

APÊNDICE DE TABELAS DE DADOS 2.....	97
APÊNDICE 3.....	102
ANEXO 1.....	108
ANEXO 2.....	111

1 INTRODUÇÃO

A recidiva dentária é um fenômeno de reação tecidual pouco estudado, com enorme impacto na clínica ortodôntica, afetando de 30 a 90% dos casos ortodônticos de 10 anos pós-tratamento (OLIVE & BASFORD, 2003; FRANZEN et al., 2013), além da recidiva imediata após a remoção dos aparelhos ortodônticos (KILICA et al., 2011).

O *turnover* das fibras gengivais supra-alveolares, que compõe o periodonto é menor do que a do osso alveolar, o que poderia levar a precipitação da recidiva dentária durante a fase de contenção ortodôntica (MELROSE & MILLETT, 1998).

O uso de dispositivos de retenção fixos, que tentam prevenir à recidiva, normalmente excedem 12 meses para providenciar um tempo apropriado de remodelação óssea e periodontal (DESTANG et al., 2003), tendo em vista que a remodelação das fibras gengivais supra-alveolares continua por 4 a 6 meses após a remoção dos dispositivos ortodônticos (REITAN et al., 1967).

Porém, estes dispositivos não controlam a remodelação óssea e periodontal, após a fase de movimentação dentária (APAJALAHIT et al., 2003, BILDIT et al., 2009), o que pode ocasionar a recidiva imediata, mesmo com a presença dos dispositivos de retenção fixa. Isto é devido a rápida formação de tecido ósseo desorganizado, com pouca mineralização, e propenso a rápida reabsorção após a movimentação dentária, até a sua completa maturação para formar osso lamelar (HSU et al., 2011).

Foi descoberto que a maior parte da recidiva dentária ocorre nas primeiras horas após a remoção da força ortodôntica (FRANZEN et al., 2013). O que leva a crer no papel fundamental da remodelação óssea no mecanismo da recidiva dentária, e relegue a um papel secundário, as fibras gengivais no mecanismo etiológico das recidivas ortodônticas.

A persistência da recidiva está relacionada com o término da completa remodelação do osso alveolar, e qualquer inibição da reabsorção do osso alveolar, ou estímulo da formação óssea, prevenirá a recidiva da movimentação dentária (HAN et al., 2010).

E esta remodelação óssea só é realizada as expensas da degradação da matriz extracelular, cujos maestros são as metaloproteinases, enzimas que catabolizam o tecido ósseo e periodontal, e têm um papel ativo no mecanismo de movimentação dentária (INGMAN et al., 2005).

Foi aventada a utilização da inciclinida (CMT-3, uma potente tetraciclina modificada quimicamente, inibidora da atividade das metaloproteinases), na prevenção do fenômeno da recidiva (BILDIT et al., 2006, 2009, KRISHNAN & DAVIDOVITCH, 2006), assim como a sinvastatina, uma

droga que atua essencialmente na fase anabólica da remodelação óssea, mas que também afeta a diferenciação de osteoclastos (GRASSER et al., 2003).

Durante a remodelação óssea, a taxa de movimentação dentária guarda uma relação com a densidade óssea local, sendo que altas taxas de movimentação dentária se correlacionam com uma densidade óssea diminuída (CHUGH et al., 2013), e provavelmente, tecidos com densidade óssea diminuída podem ser mais facilmente remodelados (BRIDGES et al., 1988).

Sendo assim, e sabendo-se que ocorre a formação de um tecido ósseo imaturo, com baixa taxa de mineralização, e propenso à rápida reabsorção após a movimentação dentária (HSU et al., 2011), o que propiciaria à recidiva ortodôntica, procurou-se correlacionar a densidade óssea local com a recidiva dentária propriamente dita, após a instituição das drogas sinvastatina e tetraciclina modificada.

Estudos adicionais são necessários para compreender melhor os efeitos destas duas drogas (sinvastatina e tetraciclina modificada), na recidiva da movimentação dentária, bem como o papel das metaloproteinases relacionados a estes dois fármacos, a remodelação óssea e a recidiva dentária propriamente dita.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA DA RECIDIVA ORTODÔNTICA

A etiologia da recidiva ortodôntica é incerta, sendo a teoria clássica da sobrecarga das fibras do tecido conjuntivo supra-alveolar a mais aceita (REITAN, 1967; PARKER, 1972). Outros autores creditam a sua origem na tensão e estresse que são formadas e acumuladas nas fibras trans-septais e nas fibras do ligamento periodontal (SADOWSKY et al., 1994), assim como ao aumento da elasticidade dos tecidos gengivais que são comprimidos em direção ao movimento dentário (REDLICH et al., 1999). Foi aventado que o periodonto exerce uma força na dentição para manter os contatos de aproximação dos dentes, e isto pode ter relação com a recidiva (SOUTHARD et al., 1992).

O efeito da força ortodôntica no tecido conjuntivo periodontal e seus componentes, como o colágeno, a elastina e colagenase são de extrema relevância para o entendimento do mecanismo da recidiva ortodôntica (REDLICH *et al.*, 1999). Alguns autores sugerem que o efeito da força ortodôntica na gengiva é similar em casos de fechamento de espaço de extração e giroversões dentárias, e que a causa provável da recidiva ortodôntica após o tratamento seria o aumento da elasticidade da gengiva comprimida, formada pela biossíntese de novas fibras elásticas e glicoproteínas (KRISHNAN & DAVIDOVITCH, 2006). Portanto, o periodonto sofre deformação elástica durante o tratamento ortodôntico que é capaz de causar recidiva durante o período de retenção pós- tratamento.

Há realmente um aumento das fibras elásticas na gengiva após a movimentação dentária induzida, mas não se sabe se este aumento persiste após a movimentação ortodôntica. Em condições normais, as fibras elásticas são dificilmente degradadas, e há poucos dados na literatura relacionados ao metabolismo do colágeno gengival após a remoção da força ortodôntica, em especial no metabolismo em longo prazo das fibras elásticas recém-sintetizadas na gengiva e no ligamento periodontal (KRISHNAN & DAVIDOVITCH, 2006).

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo que contém muitos tipos de células como: cementoblastos, fibroblastos, osteoblastos e osteoclastos e células mesenquimais indiferenciadas. Possui alto grau de *turnover* metabólico, se adaptando rapidamente ao estresse mecânico advindo de forças ortodônticas implicadas na movimentação dentária induzida.

Segundo Kyrikanides *et al.*, (2000) o equilíbrio entre a síntese do colágeno e a sua degradação no ligamento periodontal é afetado após a aplicação de uma força ortodôntica. Foram encontrados níveis elevados de condroitina sulfato, um tipo de proteoglicana, no fluido crevicular

gingival de pacientes em tratamento ortodôntico, indicando uma intensa atividade de remodelação do ligamento periodontal (BALDWIN *et al.*, 1999; WADDINGTON & EMBERY, 2001).

De fato, durante a movimentação ortodôntica, existe uma intensa remodelação, atestada pela atividade total da colagenase, que é de dez vezes maior do que a do grupo sem movimentação dentária induzida (SORSA *et al.*, 2002).

Para alguns autores, a remodelação do osso alveolar e do ligamento periodontal são os maiores responsáveis pela recidiva dentária (FRANZEN *et al.*, 2013), e são dependentes de um grupo de proteínas que degradam colágeno (colagenases) chamadas metaloproteinases (INGMAN *et al.*, 2005; BILDT *et al.*, 2009).

Durante a movimentação ortodôntica foram encontradas muitas metaloproteinases (MMPs) no fluido crevicular gengival de pacientes em tratamento ortodôntico, indicando a sua profunda participação na remodelação do tecido ósseo, que ocorre durante a movimentação dentária induzida (APAJALAHIT *et al.*, 2003, INGMAN *et al.*, 2005; BILDT *et al.*, 2009).

A família das metaloproteinases é composta por 25 enzimas proteolíticas que contribuem para a degradação da matriz extracelular do tecido ósseo, sendo produzidas por diversas linhagens celulares como os polimorfonucleares, fibroblastos gengivais, células ósseas e certo tipo de macrófagos (INGMAN *et al.*, 2005), e provavelmente são também responsáveis pelo fenômeno de remodelação óssea presente na recidiva dentária.

Durante a movimentação dentária, muitas metaloproteinases são candidatas a terem um papel crucial na remodelação óssea, como as colagenases (MMP1, MMP8 e MMP13), as metaloelastases (MMP12) e estromelina 1 (MMP3), que são as enzimas responsáveis pela degradação das fibras elásticas (KERRIGAN *et al.*, 2000), assim como as gelatinases (MMP2 e MMP9), que são um grupo de metaloproteinases que catabolizam a elastina, fibrilina, fibronectina e alguns tipos de colágeno mais relacionados ao tecido ósseo (Bildt *et al.*, 2006).

A MMP8 é expressa pelos fibroblastos no ligamento periodontal, durante a erupção dentária, e por isso é uma forte candidata juntamente com a MMP13, que foram expressas em células do ligamento periodontal de molares de ratos submetidos à movimentação dentária. (TAKAHASHI *et al.*, 2003). Segundo este autor, ocorre um aumento na expressão destas enzimas em ambos os lados de tensão e compressão, durante o movimento dos molares dos murinos *in vivo*. O aumento da expressão da MMP8 e MMP 13 no lado de tensão ocorreu no começo, e paralelamente à neoformação óssea no lado de tensão, o que as capacita como enzimas com um papel importante na remodelação do osso alveolar, durante a movimentação dentária. Porém, no lado de compressão, a expressão ocorreu de maneira indireta, induzida através de fatores solúveis *in vitro*. Isto evidencia

que a expressão das MMP13 e MMP8 é regulada diferencialmente nos lado de pressão e tensão, durante a remodelação óssea do ligamento periodontal (TAKAHASHI et al., 2003).

As metaloproteínases da matriz do ligamento periodontal são enzimas com importante função na remodelação do ligamento periodontal, em especial as glicoproteínas que compõem a matriz extracelular do periodonto (INGMAN et al., 2005).

Provavelmente, a ação de fármacos que possam atuar na inibição destas metaloproteínases, poderá inibir a recidiva dentária, e atuar no controle da remodelação óssea e periodontal (BILDIT et al., 2006; 2009; KRISHNAM & DAVIDOVITCH, 2006).

2.2 DROGAS QUE PODEM INIBIR A RECIDIVA DENTÁRIA.

Existem poucas drogas capazes de inibir a recidiva dentária, sendo que foram pesquisadas substâncias diversas com diferentes mecanismos de ação: desde proteínas endógenas sintetizadas artificialmente, mas que têm papel de controle intrínseco no mecanismo molecular da remodelação óssea (osteoprotegerina) (HOFBAUER et al., 2000), hormônios com ações fisiológicas em sítios distantes do tecido ósseo (relaxina) (MADAN et al., 2007), até a drogas utilizadas para o tratamento da osteoporose (bisfosfonatos) (KAIPATUR et al., 2013) e para o tratamento da hipercolesterolemia (sinvastatina) (HASSAN et al., 2011).

Mas o que caracteriza estas substâncias em relação ao controle da recidiva dentária é a sua ineficiência quanto a utilização em nível clínico, sobretudo devido a necessidade de realizar ensaios randomizados clínicos que possam diminuir os seus efeitos colaterais, minimizar a sua toxicidade, e maximizar os seus efeitos terapêuticos. E principalmente comprovar a sua efetividade (cl clinicamente) para com a recidiva dentária propriamente dita.

2.2.1 OSTEOPROTEGERINA

A movimentação ortodôntica envolve a reabsorção do osso alveolar pelos osteoclastos no lado de pressão, e a formação óssea por osteoblastos no lado de tensão (YABUMOTO et al., 2013). Os osteoclastos são as únicas células que participam da reabsorção de tecidos ósseos calcificados, e o seu processo de diferenciação, maturação e funcionamento é controlado por um receptor ativador kappa ligante (RANKL), que é expresso nas células osteoblásticas (SUDA et al., 1999), nas células do ligamento periodontal, e nos linfócitos T (ZHAO et al., 2012). Osteoclastos e suas células precursoras expressam o receptor ativador de NF-Kb (RANK), que interage com o RANKL via contato intercelular, induzindo a diferenciação e maturação de osteoclastos (LI et al., 2000; YABUMOTO et al., 2013).

Além disso, existe uma substância que modula este processo de ligação: a osteoprotegerina (OPG) produzida pelos osteoblastos, sendo um membro da super-família do fator de necrose tumoral, que inibe fortemente a interação entre o RANKL e o RANK por competição, suprimindo a diferenciação osteoclástica (HOFBAUER et al., 2000; YABUMOTO et al., 2013).

Um aumento na produção na expressão de OPG pode indiretamente inibir a reabsorção óssea, e têm um efeito inibitório no movimento dentário ortodôntico através da osteoclastogênese (DUNN et al., 2007; KANZAKI et al., 2004; ZHAO et al., 2012).

E em uma pesquisa recente, a transferência do gene local da osteoprotegerina (OPG) no ligamento periodontal de ratos inibiu a recidiva dentária em ratos. Foi utilizado um vetor viral inativo, assim como um plasmídeo contendo o gene da OPG, que foram injetados na superfície distal do primeiro molar superior direito que foi movimentado. Os autores utilizaram um novo método de mensuração da movimentação dentária por superposição do palato (mensurado no plano oclusal) com um software de scanner para modelo digital 3-D, após moldagem por silicone dos animais. Foram mensurados também a densidade mineral óssea (BMD) e a fração do volume do osso alveolar, na região da furca entre as raízes, através de micro-CT. Os pesquisadores encontraram um aumento na densidade óssea local, assim como uma diminuição da recidiva dentária (ZHAO et al., 2012).

2.2.2 SINVASTATINA

O fármaco sinvastatina é utilizado primordialmente como hipolipidímico, atuando como inibidor competitivo da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-Co-a), limitando a taxa enzimática, responsável pela síntese do colesterol (produto final da via do mevalonato). Portanto, é uma droga relacionada ao tratamento da hipercolesterolemia e hiperlipidemia, ou na prevenção de do risco de doenças cardiovasculares, e doenças que têm o nível sorológico aumentado, como as doenças reumatológicas, e os acidentes vasculares isquêmicos (HASSAN et al., 2011).

A sinvastatina tem outros efeitos além da redução das taxas de colesterol: a droga atua também na melhora da função endotelial, no decréscimo da função vascular inflamatória, na inibição da da proliferação dos músculos lisos, e tem efeito de imunomodulação (HASSAN et al., 2011).

Na última década, foi dado ênfase no efeito da droga no tecido ósseo (via inibição da via do mevalonato), sendo observado: expressão das proteínas morfogenéticas do osso (BMP-2), quando da sua administração local no tecido ósseo (MUNDY et al., 1999), efeito ósseo indutivo *in vitro* (MAEDA et al., 2004), estímulo à mineralização (BAEK et al., 2005) e diferenciação de células

mesenquimais em novas células responsáveis pela neo-formação óssea (HOUSHMAND *et al.*, 2010), além da droga atuar em outras vias, como a do óxido nítrico (NASSAR *et al.*, 2009).

A via do óxido nítrico, um mensageiro químico liberado por células inflamatórias e osteoclastos (KASTEN *et al.*, 1994) tem função primordial na modulação da movimentação dentária induzida (SHIRAZI *et al.*, 2002), atuando na regulação das atividades das metaloproteinases, aumentando a sua produção e potencializando a destruição da matriz extracelular (STOYANOVA *et al.*, 2005). E a sinvastatina pode modular, segundo alguns autores (NASSAR *et al.*, 2009), os níveis de produção da enzima óxido nítrico sintetase responsável pela formação do óxido nítrico. O óxido nítrico exerce potencial bifásico, afetando o recrutamento, diferenciação de osteoclastos e osteoblastos (SUNYER *et al.*, 1997), sendo que foi constatado a regulação da diferenciação dos osteoclastos pela sinvastatina (GRASSER *et al.*, 2003), possivelmente através da MMP 9, visto que esta enzima é essencial para recrutamento dos osteoclastos (ENQSIG *et al.*, 2000), ou através de controle da osteoclastogênese via OPG (HAN *et al.*, 2010).

Recentemente foi utilizada a droga sinvastatina como inibidor da recidiva ortodôntica, em trinta e dois ratos Wistar adultos, após uma movimentação dentária de 21 dias, com a aplicação de 2,5 mg do fármaco por 28 dias, e correlacionaram os seus achados com imunohistoquímica do RANKL e osteoprotegerina (OPG), confirmando o efeito inibitório da droga, com controle osteoclástico através da regulação da via OPG-Rankl (HAN *et al.*, 2010)..

Apesar da sinvastatina ser uma droga relacionada à fase anabólica ou de neoformação óssea (SINGH *et al.*, 2012), atuando na formação da proteína morfogenética do osso (BMP2) do periodonto (SINGH *et al.*, 2012), e aumentando a densidade óssea, o seu mecanismo de ação no tecido ósseo não está totalmente compreendido, podendo ter vertentes nas diversas fases da remodelação óssea, inclusive na fase catabólica ou de destruição tecidual.

Han *et al.*, (2010) pesquisou o efeito da sinvastatina na recidiva da movimentação dentária em ratos, através de uma injeção intraperitoneal de 2,5 mg, e encontrou a inibição da recidiva dentária com este método. Mensurou a recidiva da movimentação dentária através de moldes em um software para processamento de imagens. Creditou os seus achados ao controle da osteoprotegerina (OPG) sobre a diferenciação dos osteoclastos, através de imunohistoquímica, e que a droga sinvastatina pode ter induzido a apoptose de osteoclastos, através da elevação da proteína morfogenética do osso (BMP-2), que pode promover um aumento na expressão do RNAm da OPG e expressão protéica.

Também encontrou um decréscimo na quantidade do receptor ativador kappa ligante (RANKL), provavelmente pelo aumento da expressão da proteína BMP-2, que deprime a expressão do RANKL para permitir a formação de novo tecido ósseo (WISE *et al.*, 2000).

Foi hipotetizado por Han et al., (2010) que a sinvastatina possa regular os níveis de OPG e RANKL indiretamente, afetando a remodelação óssea, inibindo a reabsorção óssea, com a promoção do anabolismo ósseo, através do controle da expressão da BMP-2 no aumento da OPG e diminuição da RANKL.

Uma outra pesquisa relacionada á sinvastatina testou a injeção de proteína morfogenética (BMP-2) em uma matriz óssea seca em ovelhas, encontrando inibição na recidiva do movimento dentário (HASSAN et al., 2010).

2.2.3 BISFOSFONATOS

Os bisfosfonatos são drogas com estrutura não hidrolizada análogos aos pirofosfatos inorgânicos e atuam por seletiva adsorção a superfície do osso mineral e subsequente inibição das células responsáveis pela reabsorção óssea: os osteoclastos (KAIPATUR et al., 2013).

Os bisfosfonatos que contêm nitrogênio exibem grande potencial anti-reabsortivo, porque interrompem a prednilação do trifosfato de guanidina celular (GTPases), necessário para a formação das bordas em formas de franjas ou rugas dos osteoclastos, ativando a apoptose destas células. Uma destas drogas, o alendronato é utilizado em pacientes com osteoporose, e reduz a incidência de fraturas à médio prazo. Porém, embora efetiva na preservação da massa do tecido ósseo, estas drogas evidenciam uma matriz óssea de qualidade duvidosa no que tange as suas propriedades físicas, com perda da capacidade de absorção de energia. Além disso, com o seu uso contínuo alteram a taxa de matrix mineral do osso, levando ao aumento de fraturas atípicas ou de osteonecrose mandibular, especialmente se forem utilizadas por via parenteral (KAIPATUR et al., 2013).

Os bisfosfonatos são utilizados comumente para o tratamento da osteoporose, doenças ósseas como a doença de Paget, osteólise induzida por tumores, hipercalcemia maligna, e podem alterar a movimentação dentária ortodôntica quando utilizado em suficientes concentrações no tecido ósseo. Além disso, devido ao alto *turnover* metabólico do osso alveolar, a droga se acumula dentro do osso alveolar durante o tratamento destas doenças ósseas, e é liberada lentamente durante a movimentação dentária, interferindo com a remodelação óssea ortodôntica (KAIPATUR et al., 2013).

Kaipatur et al., (2013) utilizando-se de mini-implantes para ancoragem na movimentação de primeiros molares de 20 ratos, mensurou o deslocamento dentário através de micro-CT, e após a utilização da droga alendronato (bisfosfonato nitrogenado) encontrou inibição da movimentação

dentária induzida, com uma redução de 77% a 86% do movimento do dente em um período de 4 a 8 semanas.

Igarashi et al., (1994) observou a inibição da recidiva dentária, através de um expansor transversal aplicado nos primeiros molares de ratos, após 3 semanas de administração de bisfosfonatos (0,5 mg/kg, e comprovou a inibição de 50% da recidiva no grupo experimental em relação ao grupo controle. Utilizou um paquímetro em modelos de gesso para mensurar as distâncias entre as cúspides mesiopalatais dos molares movimentados em direção vestibular.

Kim et al., (1999) também estudaram a recidiva dentária durante 21 dias, em 42 ratos após a administração de bisfosfonatos, mas o mecanismo de movimentação utilizado, foi apenas um separador elástico. O método de mensuração da recidiva dentária foi um microscópio eletrônico de transmissão, e os autores encontraram inibição da recidiva dentária após a utilização da droga pamidronato. Encontraram também mudanças estruturais nos osteoclastos, osteócitos e ligamento periodontal induzido pelos bisfosfonatos.

2.2.4 RELAXINA

A relaxina é um hormônio da família da insulina, que é produzida na gravidez e produz alongamento do ligamento interpubial em ratos, e se liga a receptores rico em leucina, da família do receptor da proteína G (LGR7 e LGR8), influenciando os processos de *turnover* do colágeno, angiogênese, e promovendo alterações no ligamento periodontal e nas suturas do crânio (MADAN et al., 2007).

Também altera a superexpressão do colágeno em fibroblastos ventriculares, afetando a produção de colágeno em modelo de fibrose em roedores (UNEMORI et al., 1993). Este defeito na produção de fibrose é devido ao decréscimo na síntese de colágeno pelos fibroblastos, e aumento da expressão da MMP2, um tipo de metaloproteinase que degrada colágeno (MOOKERJEE et al., 2005; MADAN et al., 2007).

Existe uma ligação entre a relaxina e as metaloproteinases da matriz (enzimas que degradam a matriz extracelular), e foi encontrado que este hormônio induz a degradação destes mediadores do disco sinovial da cartilagem têmporomandibular (MADAN et al., 2007).

Baseado em suas características no metabolismo do colágeno foi sugerido a sua utilização na movimentação dentária induzida (LIU et al., 2004; MADAN et al., 2007). Porém não foi encontrado que a relaxina afeta a taxa de movimentação dentária, mas foi relatado que o seu efeito de estiramento e reorientação das fibras do ligamento periodontal (LIU et al., 2004; MADAN et al.,

2007), sendo sugerido por estes autores, a sua utilização na inibição da recidiva da movimentação dentária.

Em um estudo experimental foi encontrado que este hormônio inibiu a recidiva da movimentação dentária em ratos, e os autores encontraram um aumento da expressão das MMP1 e MMP8 analisada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), e que a droga regula o metabolismo do colágeno (HIRATI et al., 2012). Mas, recentemente em uma estudo clínico randomizado, não foi encontrado a inibição da recidiva da movimentação dentária, em um grupo de 40 indivíduos, que receberam a relaxina injetável por 8 semanas (McGORRAY et al., 2012).

2.2.5 TETRACICLINA MODIFICADA QUIMICAMENTE

As tetraciclina têm sido um grupo de drogas consideradas úteis na terapia periodontal, baseado na sua atividade antimicrobiana. E na década de noventa foram desenvolvidas tetraciclina modificadas quimicamente (CMTs), sem atividade anti-microbiana, mas que atuam na inibição da metaloproteinases, enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular de vários tipos de tecidos (GOLUB et al., 1991; GOLUB et al., 1998).

A inciclinida (CMT-3) também têm sido utilizada para atividade antitumoral, principalmente no sarcoma de Kaposi (RAMAMURTHY et al., 2002; GRIFFIN et al., 2010), devido ao seu efeito na inibição à angiogênese através da regulação da expressão do mRNA da sintetase iNO e aumento da ciclooxigenase 2-COX-2 (ACHARYA et al., 2004). Além disso, a droga é utilizada na supressão da destruição periodontal e doenças inflamatórias destrutivas como a artrite, processos degenerativos da articulação têmporo-mandibular (LLAVANERAS et al., 2001), que são relacionadas com a inibição das enzimas serina proteinase, que têm papel fundamental na modulação de citocinas inflamatórias (GUY et al., 2011).

Alguns autores (BILDT *et al.*, 2006) investigaram a atividade dos CMTs *in vitro* nas MMPs e constataram que as CMT3 (sanclina 4- dedimetilamino) e CMT8 (doxiciclina 4-dodedilamino) são as mais potentes inibidoras das MMPs, a CMT1 (tetraciclina 4 -dedimetilamino) também têm um efeito inibidor, mas menos potente, e que a CMT5 (pirazole tetraciclina) não tem efeito inibitório, e pode ser utilizado como controle das CMTs.

Bildit *et al.*, (2006) encontraram um potente efeito inibitório da CMT7 (tetraciclina 12a-dehidroxi-4-dedimetilamino) *in vitro*, contrariando um estudo realizado por Ramamurthy *et al.*, (2002), que ao aplica-lo no ligamento periodontal de ratos, foi o que teve menor efeito inibitório dentre os seis tipos de CMTs.

Foi descoberto que baixas concentrações das CMTs podem ter efeitos inversos, com o estímulo de produção de MMPs (conforme afirma BILD^T *et al.*, 2006, MAKELA *et al.*, 1998. BILD^T *et al.*, 2007) e comprovaram a inibição do deslocamento dentário ortodôntico em ratos com o CMT-3.

Mas apesar das proposições de alguns autores (BILD^T *et al.*, 2006, 2009, KRISHNAN & DAVIDOVITCH, 2006) na utilização das CMTs e seu efeito inibitório das metaloproteinases na movimentação dentária, nenhum estudo foi formado para realmente confirmar se é possível o controle pós- movimentação ortodôntica com estes fármacos e sua aplicabilidade na clínica ortodôntica (controle da recidiva ortodôntica).

2.3 JUSTIFICATIVA

A recidiva ortodôntica é um fenômeno clínico pouco estudado com um enorme impacto na clínica ortodôntica, afetando o prognóstico do tratamento em longo prazo. Os mecanismos da recidiva não são bem conhecidos, e a sua prevenção ou controle através de fármacos seria de grande valia, afetando o plano de tratamento e diminuindo a dependência do clínico aos dispositivos de retenção atualmente vigentes e trazendo maior confiabilidade aos procedimentos terapêuticos atuais.

Isto possibilitaria a diminuição ou até a eliminação dos dispositivos de retenção fixa, que às vezes são utilizados por muitos anos, e na maioria das vezes não reduzem a recidiva ortodôntica.

Além da redução de custos em relação ao tratamento ortodôntico, propiciaria uma oclusão sem recidiva ao longo do tempo, após o término da terapia ortodôntica, aumentando a efetividade da terapêutica ortodôntica.

3 OBJETIVO

3 OBJETIVO

Objetivo geral:

Analisar o efeito da tetraciclina modificada quimicamente CMT-3 (inciclinida) e da sinvastatina na recidiva da movimentação dentária induzida em ratos.

Objetivos específicos:

- 1- Quantificar a densidade do osso alveolar adjacente à raiz mesial e distal do primeiro molar superior direito, bem como a sua unidade Hounsfield, após a movimentação dentária induzida, e em especial após a aplicação da tetraciclina modificada quimicamente CMT-3 (inciclinida) e da droga sinvastatina.
- 2- Correlacionar a densidade do osso alveolar adjacente à raiz distal e mesial com a recidiva dentária após a utilização da tetraciclina modificada quimicamente CMT-3 (inciclinida) e da droga sinvastatina.

4 MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi composta por 40 ratos machos adultos da linhagem *Wistar (Rattus Norvegicus albinus)*, com quatro meses de idade, pesando em média 354 +/- 33 gramas. Eles foram mantidos em condições padronizadas com água e ração *ad libitum*, temperatura ambiente e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (06:00 -18:00) e obedecendo aos critérios de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA), da Universidade de Brasília (UnB), número 7087/2012 do parecer consubstanciado (Anexo 1).

Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais com 15 espécimes em cada grupo experimental e 10 espécimes do grupo controle (Figura 1). Os elementos dentários a serem estudados foram os primeiros molares superiores, com o lado esquerdo representando o lado experimental.

Grupo controle I: composto de 10 animais subdivididos:

5 animais controle que foram sacrificados no trigésimo nono dia, com dezoito dias de movimentação dentária induzida, com a aplicação de carboximetilcelulose a 0,5% (m/v) a partir do 19° dia até o 38° dia (20 dias).

5 animais controle que foram sacrificados no trigésimo nono dia, com dezoito dias de movimentação dentária induzida, com a aplicação de carboximetilcelulose a 0,5% (m/v) e N-Metilpirrolidona a partir do 19° até o 38° dia (20 dias).

Grupo tetraciclina II: Composto quinze (15) animais, que foram sacrificados no trigésimo nono dia, com dezoito dias de movimentação dentária, com a aplicação de solução de CMT com carboximetilcelulose a 0,5% (m/v) no 19° dia até o 38° dia (20 dias).

Grupo sinvastatina III: Composto por quinze animais (15) que foram sacrificados no trigésimo nono dia, com dezoito dias de movimentação dentária, com a aplicação da solução de sinvastatina com carboximetilcelulose a 0,5% (m/v) no 19° dia até o 38° dia (20 dias).



Figura 1: Animais da amostra

4.2 ANESTESIA DOS ANIMAIS

Os animais foram sedados com ketamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg) aplicados por via intraperitoneal, para a inserção dos dispositivos ortodônticos, bem como para a realização das microtomografias.

4.3 MOVIMENTAÇÕES DENTÁRIAS INDUZIDAS

4.3.1 Mesa operatória

Foi confeccionada uma mesa operatória segundo o desenho de Houston *et al.*, (1964) e aperfeiçoada por Salles *et al.*, (1989) (Figura 2). Os animais foram colocados à mesa operatória, contidos e mantidos por meio de argolas com a boca aberta (Figura 3). A mesa de madeira tinha 36,25 cm de comprimento por 25,00 cm de largura e 1 cm de espessura, sendo a base retrátil (onde foram inserido as argolas de retenção de 2,6 cm de diâmetro) com comprimento de 19,5 cm por 25 cm de largura, e circunferência (para a passagem da cabeça do animal) de cerca 7,5 cm de diâmetro, distando 6,0 cm de cada lado (Figura 2 e 3).

Foram utilizados os seguintes materiais para à instalação dos dispositivos de movimentação dentária induzida:

- Mola espiralada fechada de 4 mm de comprimento com fio de 0.006 x 0.022 polegadas da marca comercial Morelli.
- Fio amarrilho de 0,14 mm especialmente fabricado pela empresa Morelli.

- Fio amarrilho de aço inoxidável 0.025 mm da marca Morelli.
- Um compasso de ponta seca.
- Um paquímetro manual.
- Um alicate de corte de amarrilho.
 - Uma pinça de Mathieu de 10 cm.
 - Uma pinça clinch
 - Uma pinça Dietrich
 - Um afastador 2/4 Molt
 - Um espelho clinico
 - Um dobrador de amarrilho
- Uma broca diamantada 2200F KG Sorensen
- Uma broca diamantada ½ FG Weisengerm
- Resina composta Filtek Z250 XT da marca 3M
- Primer Adiper Single Bond 2 da marca ESPER 3M
- Ácido fosfórico 37% condac 37 da marca FGM
- Microbrush da marca KG brush
- Equipo odontológico com seringa tríplice e compressor
- Uma caneta de alta rotação da Dabi-atlante MS350
- Um refletor odontológico
- Um sugador endodôntico
- Um sugador descartável
- Gaze



Figura 2: Mesa operat6r



Figura 3: Instalação e contenção dos animais

4.3.2 Molas espiraladas fechadas

Foram instaladas molas espiraladas de acordo com o modelo proposto por Heller & Nanda, (1979) consistindo de molas fechadas de 0.006 x 0.022 polegadas da marca comercial Morelli (ref. 35.20.061).

Elas foram mensuradas no comprimento de 4 mm, através de um compasso de ponta seca precisamente calibrado com um paquímetro manual. Após marcação com uma caneta de tinta permanente no rolo de fio de aço, suas extremidades foram separadas através de um alicate de corte de amarelo, permanecendo dois helicoides para instalação dos amarrilhos metálicos (FRACALOSSI *et al.*, 2009; MALDONATO, 2009).

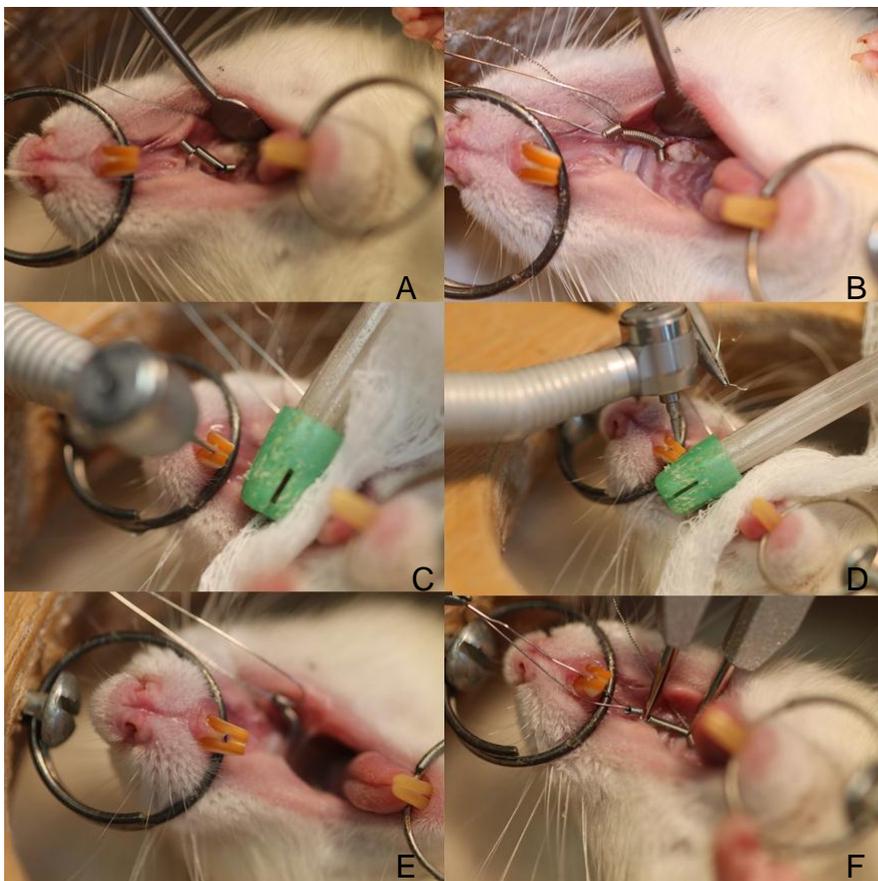
As molas foram instaladas com o auxílio de uma pinça Mathieu, e um fio de amarelo de aço de 0.14 milímetros e 9 cm de comprimento, especialmente fabricado, entre o primeiro molar superior esquerdo e o incisivo ipsilateral. O amarelo foi passado entre o espaço interproximal do primeiro e segundo molar, prendendo uma extremidade da mola.

A outra extremidade da mola foi fixada no incisivo superior, sendo realizado um orifício entre os dois incisivos para transpasse de uma extremidade do fio de amarelo 0,25 mm, através de uma broca esférica número ½ FG marca Weisengerm. Entre os incisivos superiores foi criado um reforço

mecânico com uma broca troco-cônica 2200 da KG Sorensen, constituindo-se de um pequeno sulco méso-cervical e disto cervical do elemento da coroa dentária para o encaixe de dois fios de amarrilho de aço inoxidável de 0,25 mm da Morelli (visto que no primeiro piloto, as molas desprenderam-se dos incisivos, tendo apenas um fio de amarrilho de 0,25 mm), que foram fixados com resina Filtek MR Z-250 XT da marca 3M, após condicionamento ácido fosfórico 37% condac 37 da marca FGM, e primer Adper- Single Bond 2 da marca ESPE 3M.

Uma força inicial de 75 cN foi mensurada por um dinamômetro de precisão, devidamente aferido e calibrado, da marca Correx, com limites mensuração compreendidos entre 25 g e 250 g, equivalente a 2 mm de comprimento adicional, perfazendo-se 6 mm de comprimento total das molas, que foram aferidas por um compasso de ponta seca durante a sua instalação (FRACALOSSI *et al.*, 2009; MALDONATO, 2009).

Após a ativação inicial, a aparatologia não recebeu nenhuma ativação, durante o período experimental, sendo conferido diariamente o correto posicionamento do dispositivo de movimentação dentária induzida. A movimentação ocorreu em direção mesial do primeiro molar superior esquerdo e foi objeto de estudo, desprezando a movimentação em direção palatina do incisivo superior ipsilateral (Figura 4).



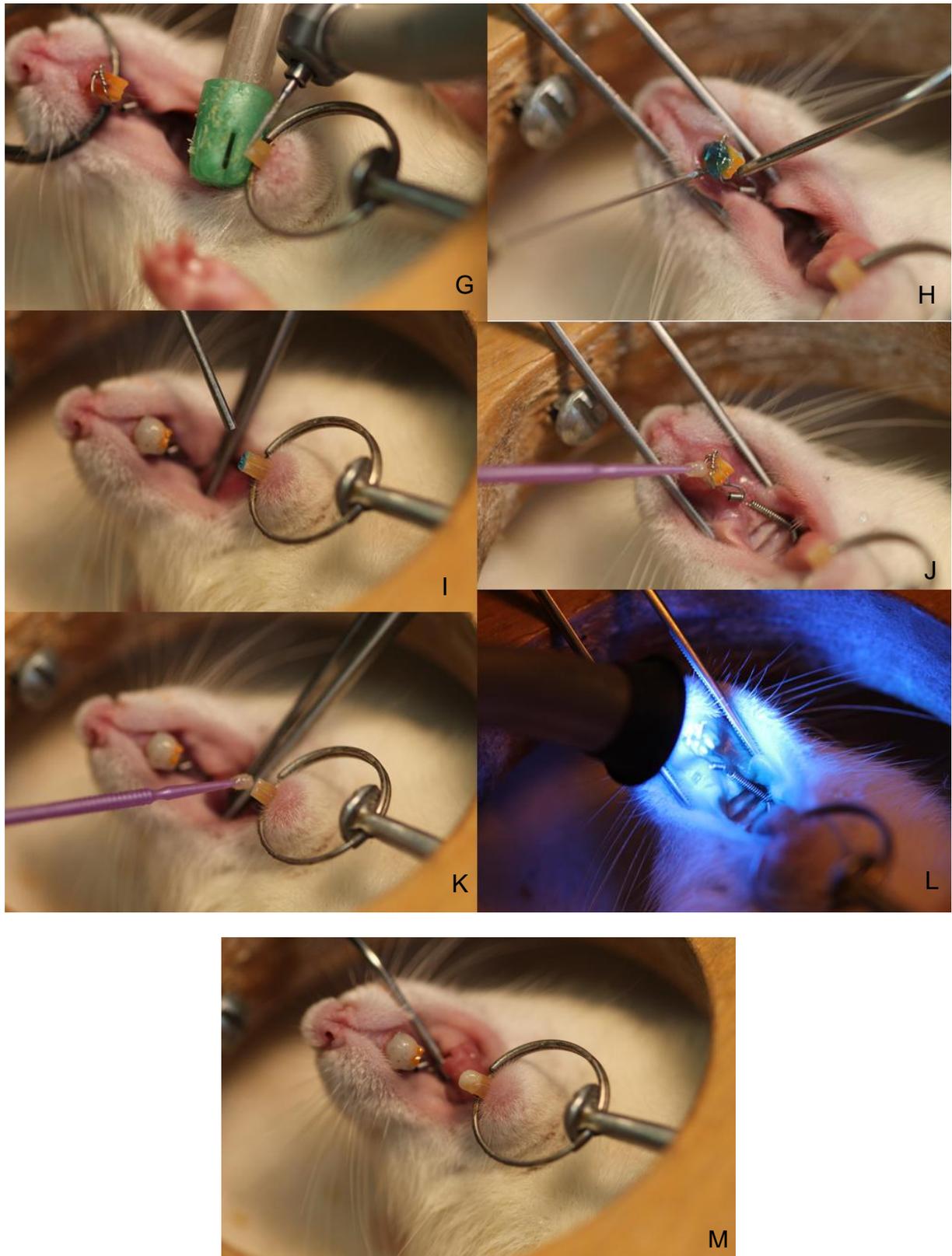


Figura 4: Procedimentos de instalação das molas. A - Instalação do fio amarelo no espaço entre o primeiro e segundo molares murinos. B - Fio amarelo preso à extremidade da mola. C - Confecção

do orifício central. D - confecção da canaleta mesial e distal nos incisivos superiores. E-Vista das canaletas confeccionadas. F - Mensuração da mola com compasso de ponta seca para aferir 6mm de comprimento, correspondente a 75 cN de força. G - Fixação da outra extremidade da mola com 2 fios de amarrilho nos incisivos e corte dos dentes mandibulares antagonistas. H e I - Condicionamento ácido nos incisivos superiores e inferiores respectivamente. J e K - Aplicação do primer nos incisivos superiores e inferiores. L e M - Aplicação da resina e fotopolimerização nos incisivos murinos.

4.4 DIETA ESPECÍFICA

Após a instalação das molas, os animais foram alimentados com uma ração moída (através de um liquidificador caseiro), para amenizar o efeito da quebra dos dispositivos de movimentação dentária induzida. Após 18 dias de dieta especial, os animais tiveram as molas removidas, e voltamos a instituir a alimentação normal dos animais, através de ração convencional.

4.5. REGIME DE TRATAMENTO

A tetraciclina modificada foi administrada diariamente por gavagem oral, na dose de 30 mg/kg, sendo os volumes administrados (proporcionais aos pesos dos animais), durante 20 dias, no dia seguinte ao final do período de movimentação dentária induzida.

A sinvastatina foi administrada por gavagem oral na dose de 5,0 mg/kg, sendo os volumes administrados (proporcionais aos pesos dos animais) durante 20 dias, a partir do último dia do período de movimentação dentária induzida.

Foi utilizada a carboximetilcelulose a 0,5% (m/v), como veículo, em ambas as drogas, sendo administrada 400 μ L da droga ou placebo, através de uma sonda para gavagem oral acoplada a uma seringa de insulina de 1 mL.

4.5.1 Solução de tetraciclina modificada quimicamente (CMT).

A solução de estoque de tetraciclina modificada foi preparada segundo o método proposto por Li *et al.*, (2002) e consistiu na dissolução da 30 mg de tetraciclina modificada quimicamente em 100 μ L de uma solução de n-metilpirrolidona a 5% de etanol. Foi realizado em uma capela de fluxo laminar, a mistura de 13,6 mL de n-metilpirrolidona, um solvente orgânico, contendo 5% de etanol (680 μ L), em 4000 mg de tetraciclina modificada quimicamente (inciclinida), “gentilmente cedido” pela empresa francesa Galderma^R (Figura 5), perfazendo a concentração de 294,1 mg/mL da droga na solução.

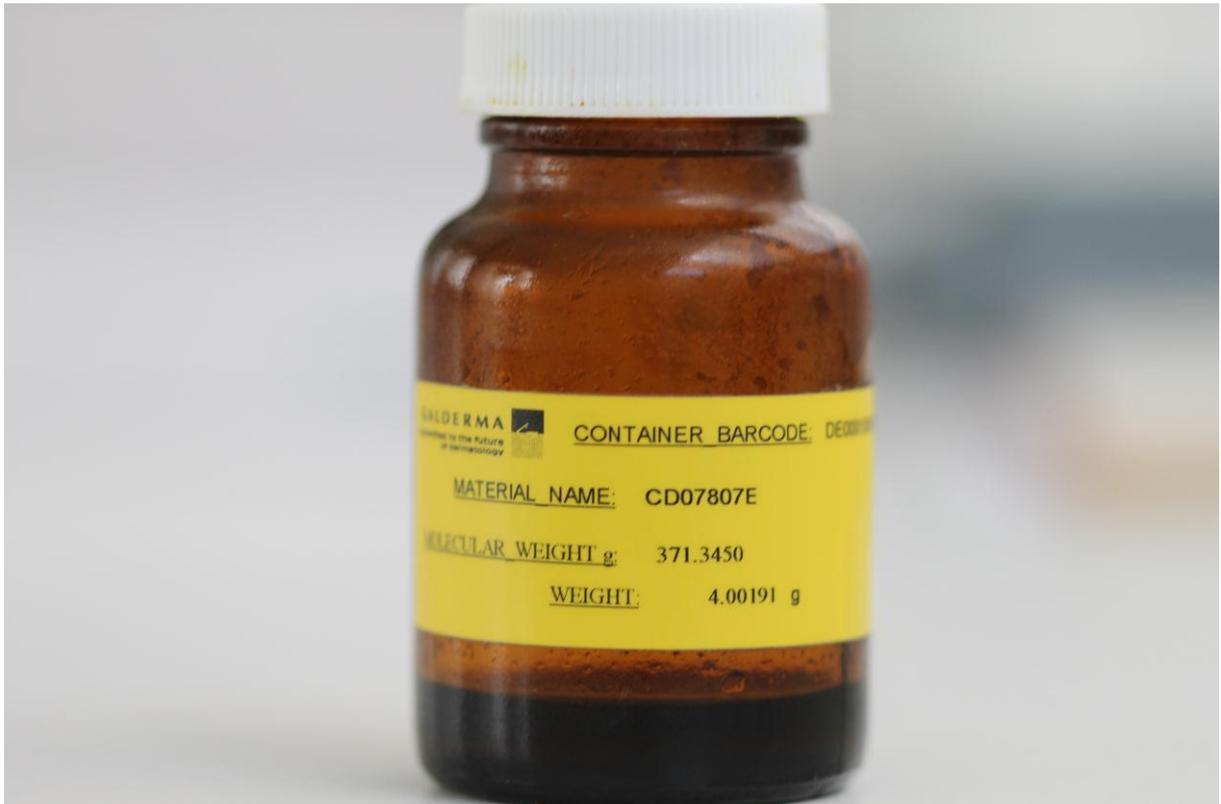


Figura 5: Tetraciclina modificada da Galderma^R, que foi preparada como solução de estoque.

4.5.2 Solução de carboximetilcelulose

A solução foi preparada, inicialmente a 2% (m/v), empregando-se 2 g de carboximetilcelulose de sal sódico P.A. da Impex (Figura 6), dissolvidos em 100 mL de água destilada, em um vórtex, e aquecida a 290° Celsius, até a formação de uma substância cristalina e homogênea (LI *et al.*, 2002), que por sua alta viscosidade dificultou a realização da gavagem oral.

Posteriormente foram empregados 0,5 g de carboximetilcelulose 0,5% (m/v) dissolvidos em 100 mL de água destilada, também com o auxílio de um vórtex, e aquecida a 290° Celsius, que se mostrou satisfatória para a realização da gavagem oral, dada a sua pequena viscosidade, segundo Hassan *et al.*, (2011).

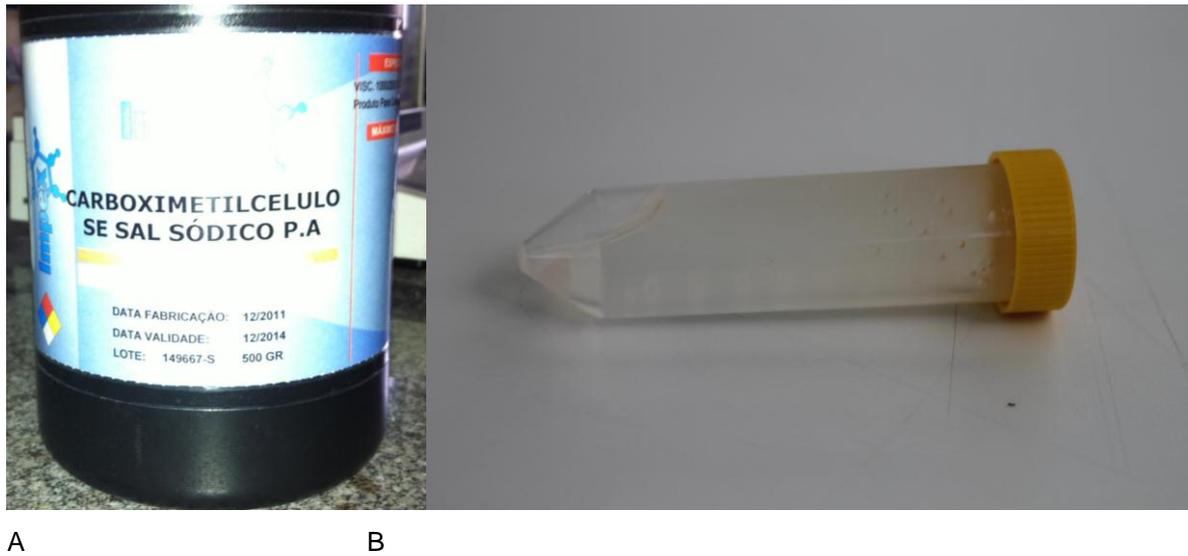


Figura 6: Carboximetilcelulose. A- CMC sal sódico P.A. B- CMC preparada a 0,5%.

4.5.3 Cálculo da dosagem da CMT por massa dos animais

Após a preparação da solução de estoque foi administrada 30mg/kg da droga, que corresponde a 102 μL da solução de estoque, sendo adicionado carboximetilcelulose a 0,5 % (m/v), de acordo com o peso dos animais (Figura 7), perfazendo 400 μL ou 0,4 mL na seringa de insulina por animal. Nos animais controle, foi realizado o mesmo cálculo do grupo experimental, mas, ao invés da droga, foi adicionada a n-metilpirrolidona à carboximetilcelulose 0,5% (m/v).



Figura 7: Pesagem semanal dos animais para cálculo das soluções das drogas

4.5.4 Solução de estoque de sinvastatina

A solução de estoque de sinvastatina foi preparada de acordo com Jabbari *et al.*, (2011) evitando-se altas doses, pois segundo Singh *et al.*, (2012) altas doses de sinvastatina fogem da prescrição normal, sendo que 10mg/kg ao dia em ratos é uma alta dose que corresponderia em termos farmacocinéticos, a 70 mg ao dia em humanos, o que nos levou a adotar 5mg/kg ao dia em ratos, equivalente a 20 a 40mg da dose diária normalmente utilizada em humanos, além de ser o dobro da dose realizada no experimento de Han *et al.*, (2010) que estudou o efeito da sinvastatina na recidiva do movimento dentário em ratos, apesar do mesmo realizar a via de administração intraperitoneal (2,5 mg/kg ao dia).

Foi dissolvido 350 mg de sinvastatina, fornecida pelo laboratório Attivos Magistrais- grupo farmacopeia, em 58,3 mL de água destilada, com o auxílio de um vórtex, até a sua completa homogeneização e solubilização, perfazendo uma solução da droga com concentração de 6 mg/mL

4.5.5 Cálculo da dosagem de sinvastatina por massa dos animais

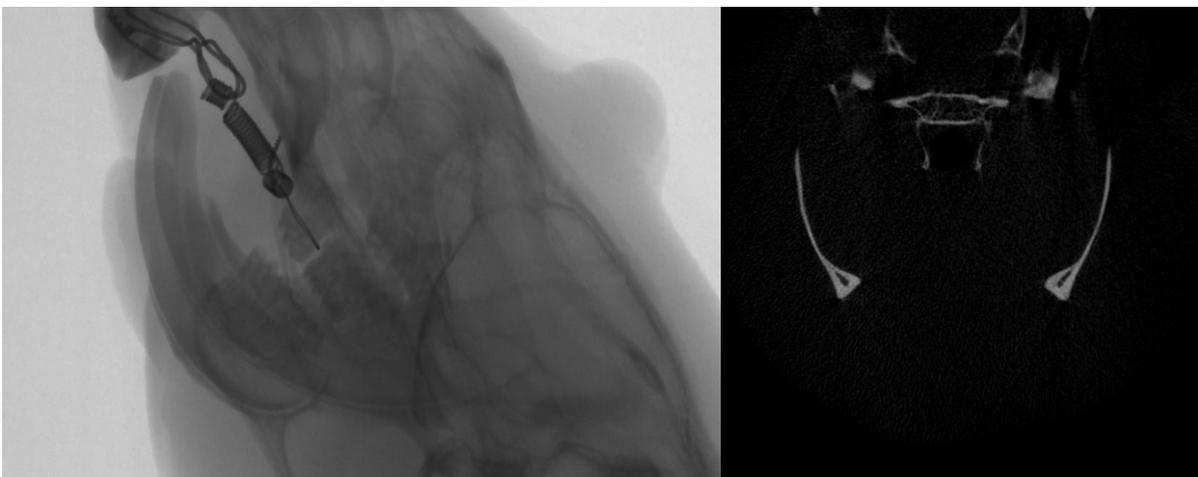
O cálculo foi realizado de acordo com a massa dos animais aferidos semanalmente, sendo que para uma dose de 5 mg/kg de sinvastatina corresponderá 249,8 μ L da droga na solução de estoque, bastando completarmos para 400 μ L, a carboximetilcelulose a 0,5% (m/v), de maneira a termos 0,4 mL de uma dose na seringa de insulina. Nos animais controle, foi adicionado apenas a carboximetilcelulose a 0,5% (m/v), sem a utilização da droga.

4.6 AQUISIÇÕES DAS IMAGENS

A aquisição de imagens foi realizada com o auxílio de um micro tomógrafo Skyscan 1076 *in vivo* micro-CT- Bruker-microCT (Figura 8), que gerou imagens radiográficas micro CT (Figura 9a), e posteriormente foram reconstruídas com o software N-Recon- 1.6.9.4-Bruker-microCT (Figura 9b).



Figura 8: Microtomógrafo Skyscan1076



A

B

Figura 9: Aquisição de Imagens: A- Micro CT. B- Reconstruídas

Foram utilizados os seguintes parâmetros para a geração das imagens micro CT, que levou cerca de 7 minutos para cada espécime:

- Voltagem 100 Kv
- Filtro Al 1,0mm
- Resolução de 35 μ m

Além disso, para reconstrução das imagens foi utilizado os seguintes parâmetros:

- Valor mínimo- 0.004915
- Valor máximo- 0.064752

4.7 AVALIAÇÕES MICROTOMOGRÁFICAS

Foram realizadas três avaliações microtomográficas respectivamente:

- Primeira micro-CT, 4 a 7 dias após a instalação das molas nos animais, que variou de quatro a sete dias, após a instalação das mesmas.
- Segunda micro-CT, após dezoito (18) dias de movimentação dentária em todos os grupos.
- Terceira micro-CT, após vinte (20) dias da prescrição da droga nos respectivos grupos, no trigésimo oitavo dia.

4.8 QUANTIFICAÇÕES DO MOVIMENTO DENTÁRIO

A quantificação do movimento dentário foi realizada inicialmente com as radiografias micro CT, e foi realizada com o auxílio do software Data Viewer versão 1.5.0.0- Bruker-microCT, que selecionou 120 imagens para posterior confecção das guias de mensuração e aferição do movimento dentário, através do software Image Pro^R Plus 5.1- Media Cybernetics (referentes às três tomadas microtomográficas). Outro método de mensuração semelhante foi também utilizado, que selecionou as imagens reconstruídas, (120 imagens) também por intermédio do software Data Viewer 1.5.0.0- Bruker-microCT, e remetidas para posterior confecção das guias de mensuração e aferição pelo software Image Pro^R Plus 5.1-Media Cybernetics.

4.8.1 Seleções das imagens (Data Viewer)

Foram escolhidas 40 imagens de reconstrução microtomográfica relativos à execução de uma única tomada microtomográfica, e através do software Data Viewer, escolhidas 40 imagens no plano sagital, que pudessem ser utilizadas para a confecção das áreas de análise densitometria.

Isto foi realizado para as três tomadas microtomográficas, o que resultou em 120 imagens para a confecção de um círculo de 60 x 60 pixels, que abrangesse a raiz mesial e sua estrutura óssea circunvizinha, com o auxílio do software CT Analyser 1.13 Bruker micro CT, correspondente aos 40 animais nas três tomadas microtomográficas.

A seleção das 120 imagens reconstruídas e radiografias micro CT foram realizadas com o software Data Viewer 1.5.0.0- Bruker-microCT, que através da utilização de coordenadas x, y, z, representando os respectivos planos espaciais: vertical, horizontal e transversal, visualizou as raízes (distais) do primeiro molar e (mesiais) do segundo molar esquerdo dos murinos, no plano sagital, que melhor se aproximassem dos seguintes parâmetros: nitidez das imagens ao longo de todo o comprimento das respectivas raízes, visualização dos três molares dos murinos no mesmo plano, e ausência de artefato ou sobreposição que impedisse a visualização das estruturas anatômicas (Figura 10 e 11).

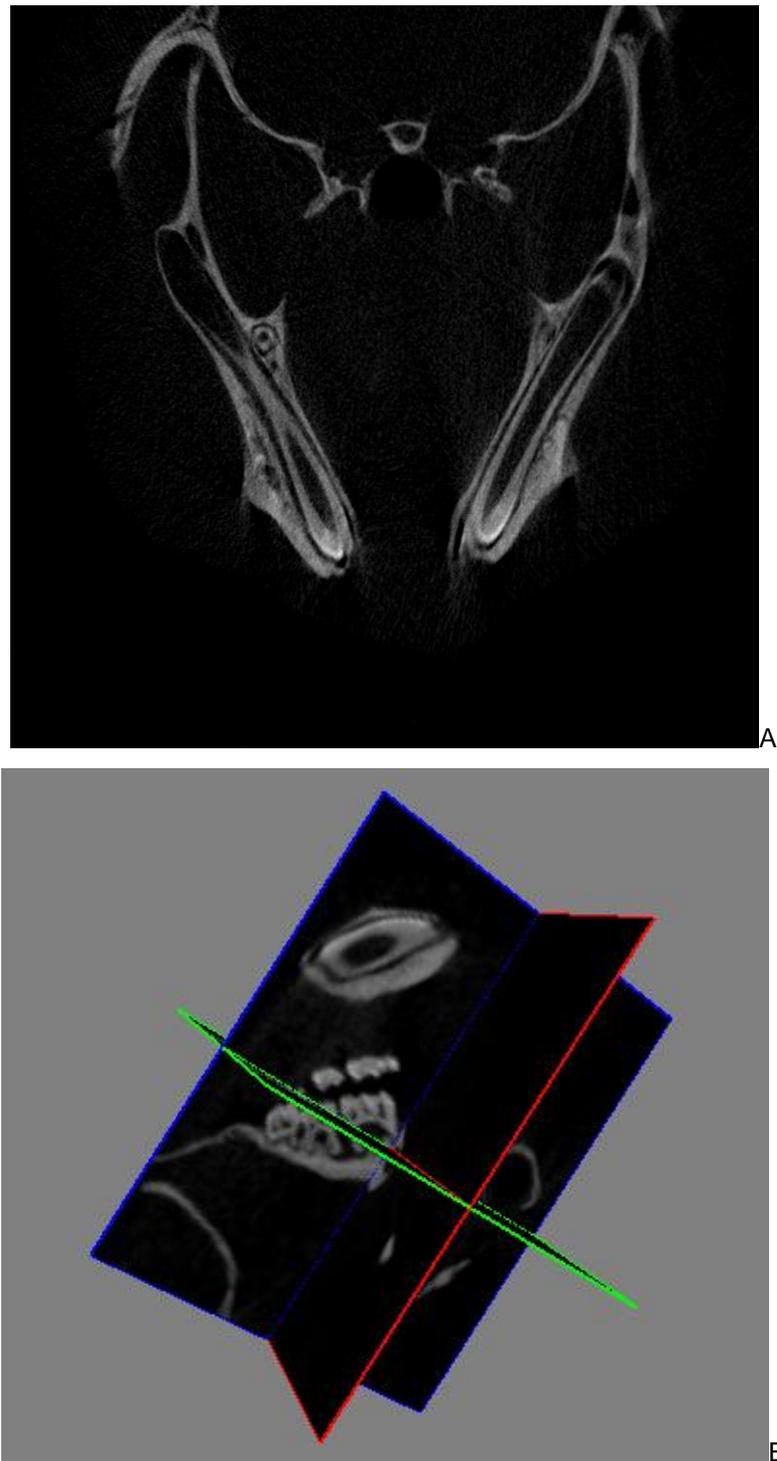
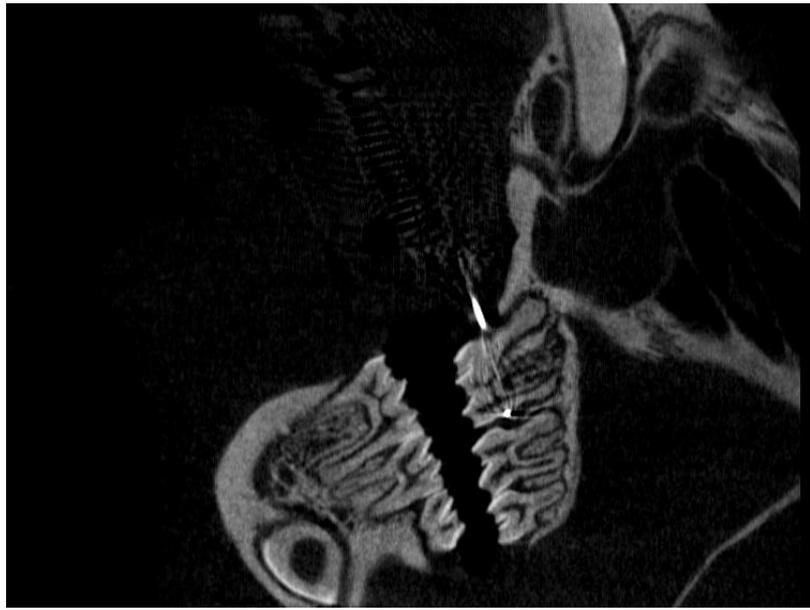
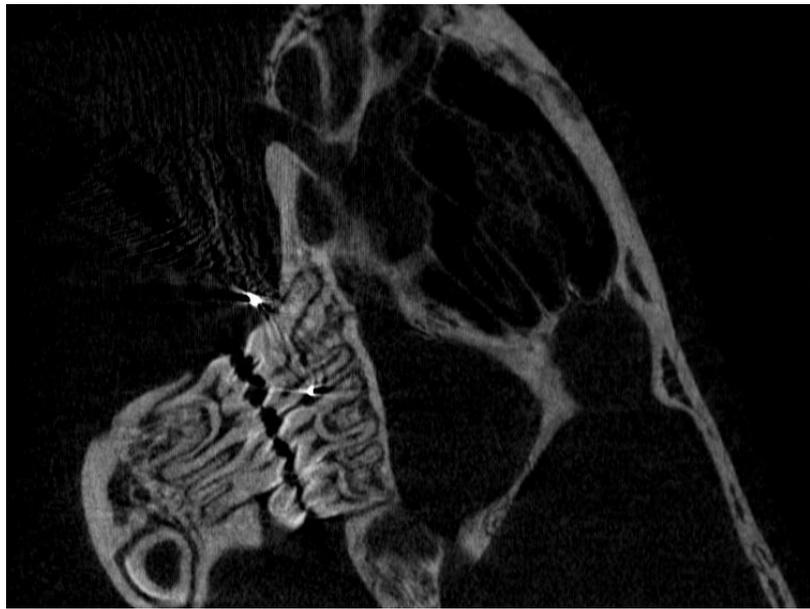


Figura 10: Imagens reconstruídas: A- Imagem reconstruída pelo programa N-Recon- 1.6.9.4-Bruker-microCT. B- Selecionadas pelo sistema de coordenadas x, y, z.



A



B

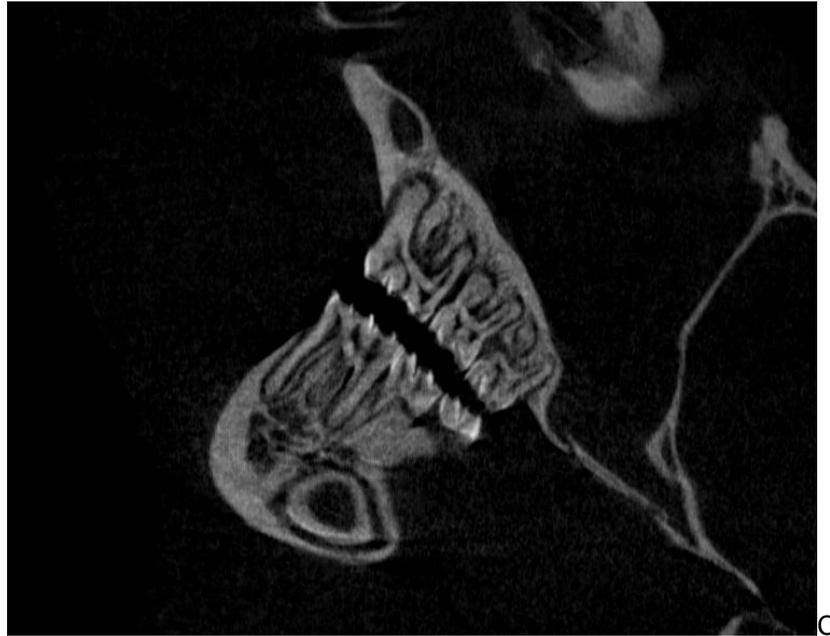
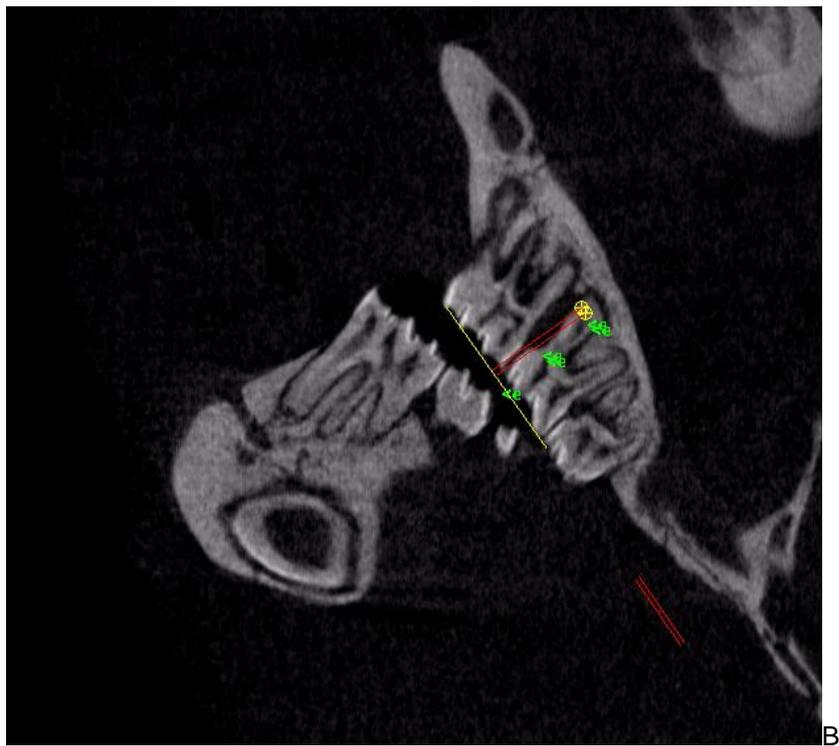
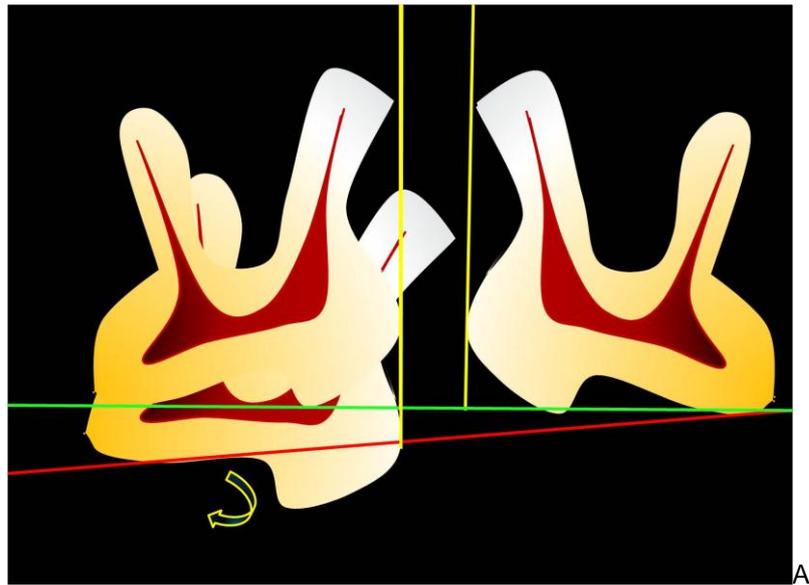


Figura 11: Imagens reconstruídas escolhidas através do software Data Viewer- 1.5.0.0-Bruker-microCT para a realização dos guias de mensuração. A- Imagem escolhida após 18 dias de movimentação dentária (2º tomada microtomográfica). B-Imagem escolhida após 7 dias de movimentação dentária (1º tomada microtomográfica). C- Imagem escolhida após a aplicação da droga (3º tomada microtomográfica).

4.8.2 Confeccões dos guias de mensuração

Os guias de mensuração foram realizados com o software Image Pro^R plus 5.1- Media Cybernetics, e consistiram na realização de uma reta representando o plano oclusal, que tinha como origem e fim: a ponta de cúspide mesiovestibular do primeiro molar superior esquerdo e a ponta de cúspide distovestibular do segundo molar esquerdo murino. Após a confecção do plano oclusal, baseado nestes elementos dentários, foram traçadas duas perpendiculares tangenciando os pontos de maior convexidade da raiz distovestibular do primeiro molar esquerdo e da raiz mesiovestibular do segundo molar esquerdo do murino (Figura 12), minimizando os erros de mensuração advindos do movimento de inclinação e extrusão do primeiro molar do rato (GONZALES et al., 2009).



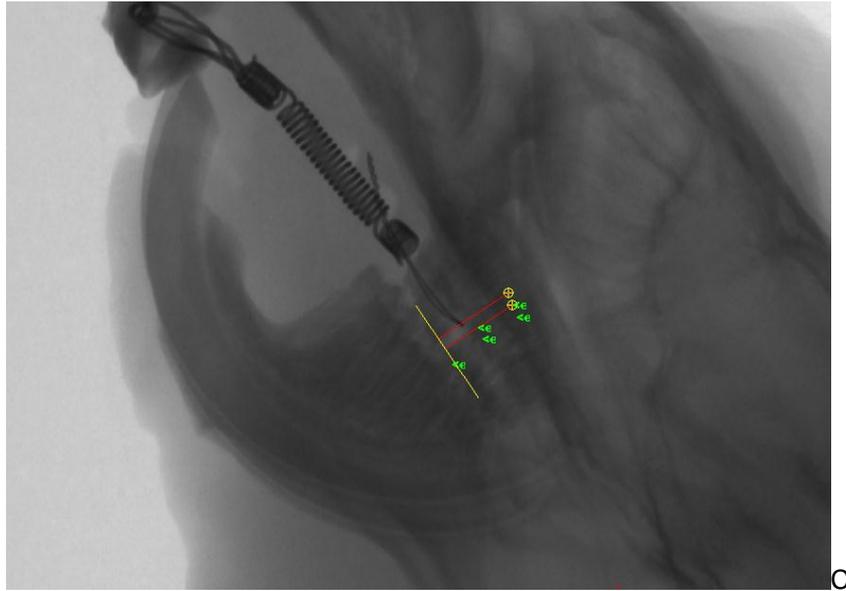
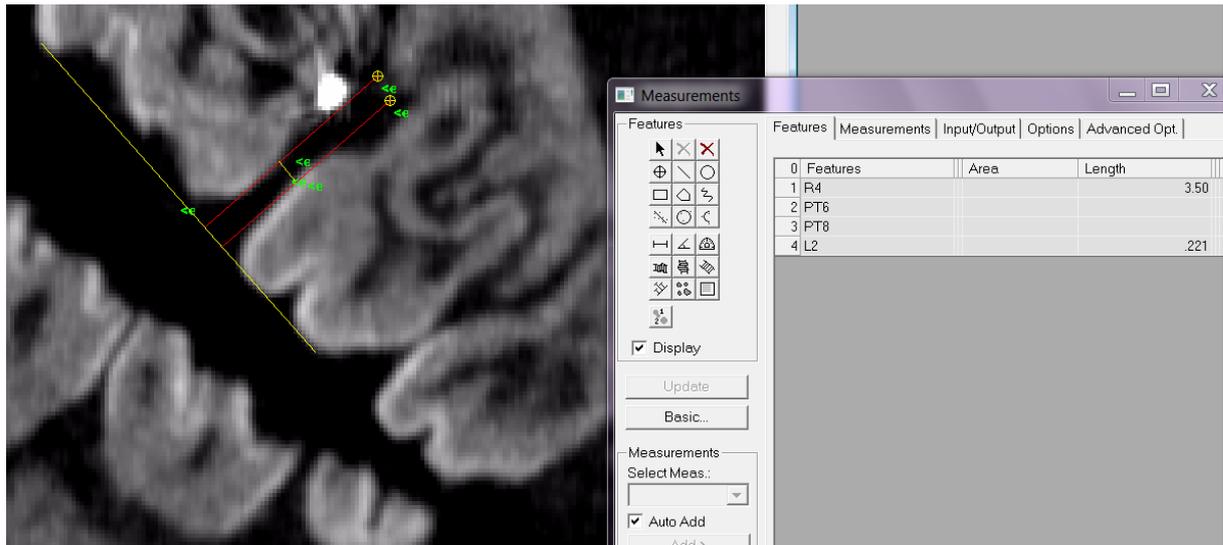


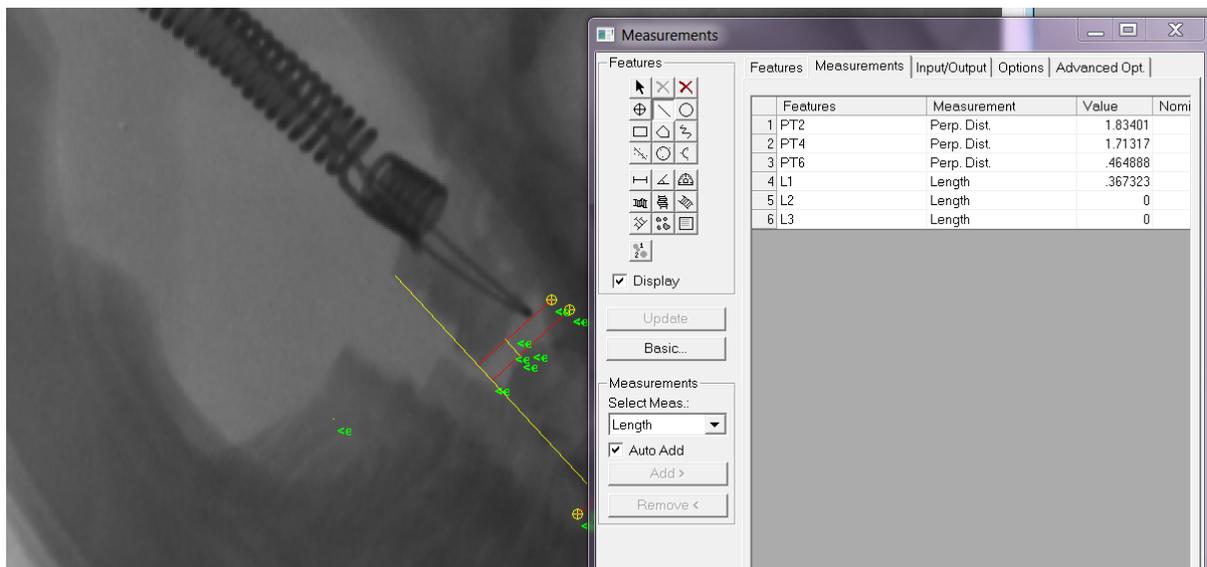
Figura 12: Confecção das guias de mensuração: A- Esquema representando a extrusão e inclinação do primeiro molar murino, cuja guia de mensuração minimiza os erros de aferição entre os molares. B- Imagem reconstruída escolhida com guias de mensuração, C- Imagem radiográfica micro CT escolhida com guias de mensuração.

4.8.3 Mensurações das imagens.

A mensuração das imagens foi obtida através do software Image Pro^R Plus 5.1- Media Cybernetics de duas formas: primeiramente com as radiografias micro CT, e depois com as imagens reconstruídas (Figura 13).



A



B

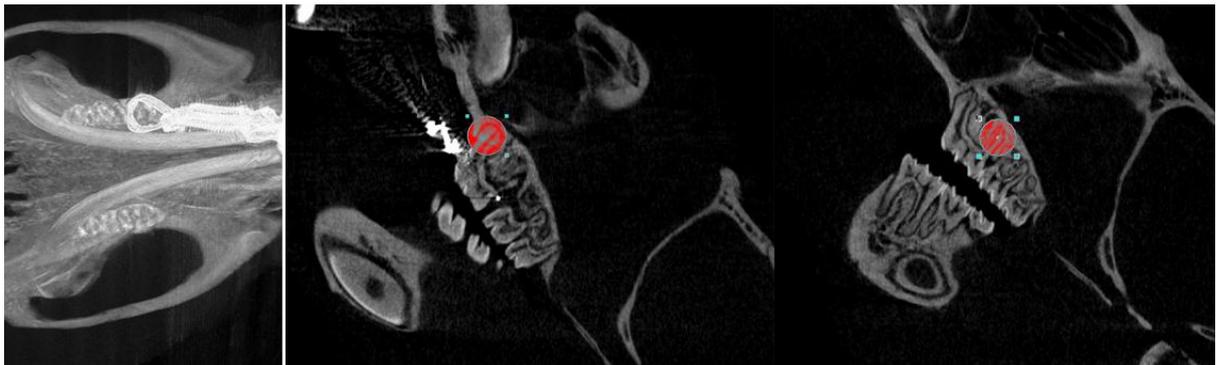
Figura 13: Mensuração do movimento dentário através do software Image Pro^R-Plus A- Nas imagens reconstruídas. B- Nas radiografias micro CT.

4.9 DENSITOMETRIA ÓSSEA

A densitometria foi realizada com o software CT Analyser 1.13 Bruker micro CT, utilizando-se de imagens tomográficas pelo software Dataviewer 1.5.0.0 no plano sagital, através de um sistema de coordenadas X, Y e Z, onde foram selecionadas regiões de interesse, através da visualização da raiz mesial e distal do primeiro molar superior esquerdo. O parâmetro utilizado para a delimitação do limite superior e inferior, da região compreendida pelas imagens micro CT, foi à distância de 544 mm

entre o completo desaparecimento da raiz mesial e distal de uma imagem Micro CT para outra imagem de igual resolução.

A região de interesse ROI consistiu de um círculo de 60 x 60 pixels, que abrangesse a raiz mesial e distal, bem como a sua estrutura óssea alveolar circunvizinha, sendo o critério utilizado para todas as imagens micro CT analisadas (Figura 14).



a

b

c

Figura 14: Marcação da área circular (ROI) na imagem reconstruída de 60 x 60 pixels na raiz mesial (b) e distal (c) do primeiro molar superior esquerdo para aferição da densidade óssea na região delimitada, após a reconstrução das imagens de um corte transversal .

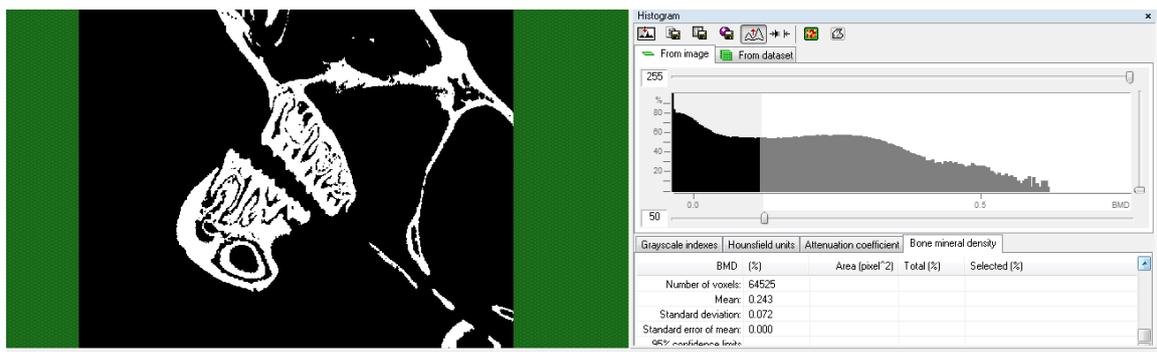


Figura 15: Mensuração da densidade mineral óssea pelo software CT-Analyser

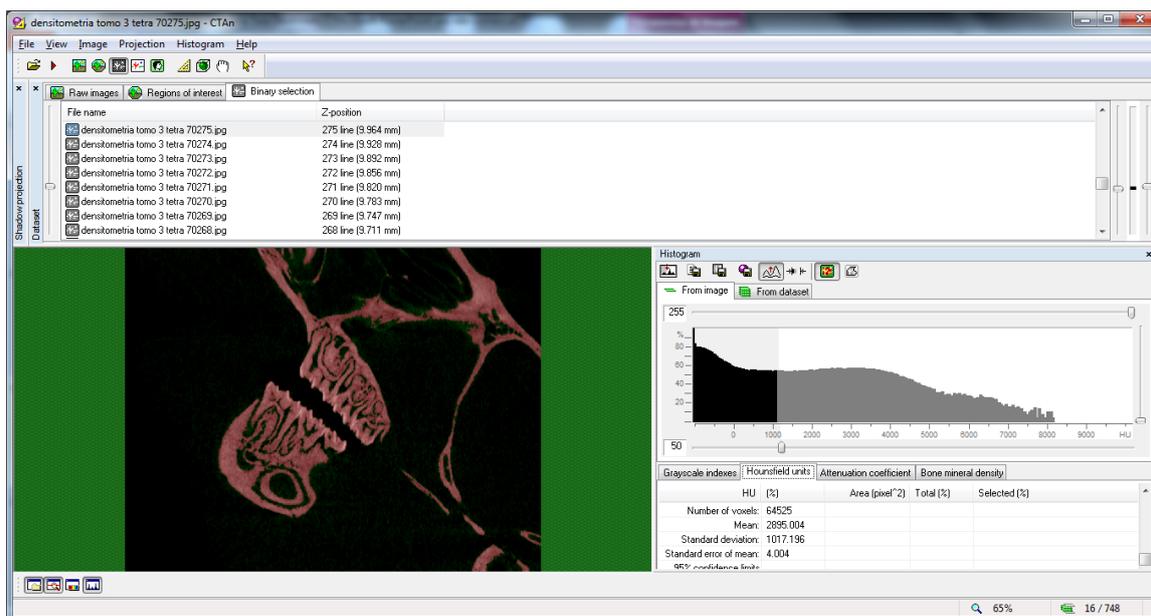


Figura 16: Mensuração da unidade Hounsfield pelo software CT-Analyser

Foi mensurada além da densidade mineral óssea (Figura 15), a escala linear absoluta (escala Hounsfield) definida somente por dois pontos: de -1000 para a atenuação do ar seco, e zero (0) para a água pura a 25 graus Celsius para o efetivo escaneamento da energia utilizada (Figura 16), sendo que o número CT de cada voxel deverá ser uma reflexão acurada do coeficiente de atenuação tecidual verdadeira de cada elemento anatômico presente (CHUGY et al., 2013).

4.10 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

A eutanásia dos animais foi realizada através de uma câmara de gás presente no biotério do instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília-UnB, através de gás monóxido de carbono por um período de 10 minutos, até o completo óbito dos animais.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.11.1 Erro do Método

Para a avaliação do erro do intra-examinador, foram traçadas e mensuradas novamente 40 guias de mensuração com suas respectivas aferições, das 120 microtomografias CT selecionadas e das 120 imagens reconstruídas e selecionadas, 30 dias após a realização das mensurações iniciais, valendo-se novamente do software Image Pro^R Plus 5.1- Media Cybernetics.

4.11.2 Erro casual

O erro casual, decorrente da dificuldade da aferição das imagens, foi calculado com a aplicação da fórmula matemática proposta por DAHLBERG (1940) apud HOUSTON, 1983.

A fórmula proposta dita que o erro entre medidas tomadas em tempos diferentes é igual à raiz quadrada da somatória das diferenças entre os pares das mesmas (d^2) dividido por duas vezes o número de pares da medida:

$$Se^2 = \sum d^2 / 2n, \text{ ou } Se = \sqrt{\sum d^2 / 2n}$$

Foram considerados valores acima de 0,2 mm para as variáveis lineares, como erros significativos.

4.11.3 Análise estatística propriamente dita

Foram realizadas comparações intragrupos e intergrupos aplicando-se os seguintes testes estatísticos:

Estatística descritiva: média, desvio padrão, valor mínimo, valor máximo da movimentação inicial, medial e final.

Foi realizado um teste de hipótese bicaudal com nível de significância de 0.05, através do software Statistical Package for Social Sciences–SPSS-20.

Através de uma análise univariada foi realizado o teste de normalidade de Shapiro Wilk, que testou a distribuição das frequências, indicando que os dados para micro-CT não seguiam a curva normal, exigindo a realização de testes não paramétricos.

Foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com *Post-hoc* de Dunn para avaliação entre os três grupos com relação à recidiva nos grupos micro-CT, com um nível de significância de 0,05. O peso dos animais e a densidade óssea mineral (raiz mesial e distal), entre os grupos foram avaliados por ANOVA com pós-hoc de Tukey, com um nível de significância de 0,01.

- Teste ANOVA-unidirecional

A ANOVA visa comparar a variação da média dos três grupos com a média geral de todos os espécimes do experimento, representando o efeito dos diferentes tratamentos. A variação do

tratamento será representada pelo somatório da variação entre tratamentos e variação dentro do tratamento. Isto foi realizado para a densitometria óssea e para o peso dos animais.

A variação entre grupos experimentais é estimada pela variação entre tratamentos, e a variação dentro do mesmo tratamento é estimada pela média das variâncias de cada grupo (variância dentro dos tratamentos), mas ela representa a fração da variabilidade que não é explicada pelos efeitos do tratamento. (variância do erro experimental).

-Teste *Post hoc*-Tukey

Visa a determinar quais as médias tomadas duas a duas, diferem significativamente entre si.

-Coeficiente de correlação de Spearman

Visa a comparar e correlacionar os parâmetros da densidade mineral óssea final e a recidiva da movimentação dentária induzida nos três grupos analisados.

Este teste foi utilizado por que um dos dados analisados utilizaram métodos estatísticos não paramétricos (movimentação dentária e recidiva dentária) em comparação com os dados que utilizaram métodos paramétricos (densidade mineral óssea final da raiz mesial e distal).

5 RESULTADOS

5.1 CORTES E RECONSTRUÇÕES TOMOGRÁFICAS

Foram realizadas 283 aquisições tomográficas em cada animal durante uma única execução do micro CT, que gerou 11.320 imagens por uma única execução do micro CT nos 40 animais, e 33.960 imagens em todas as três execuções do micro tomógrafo durante o experimento (Figura 17), que foram reconstruídas através do software N-Recon.

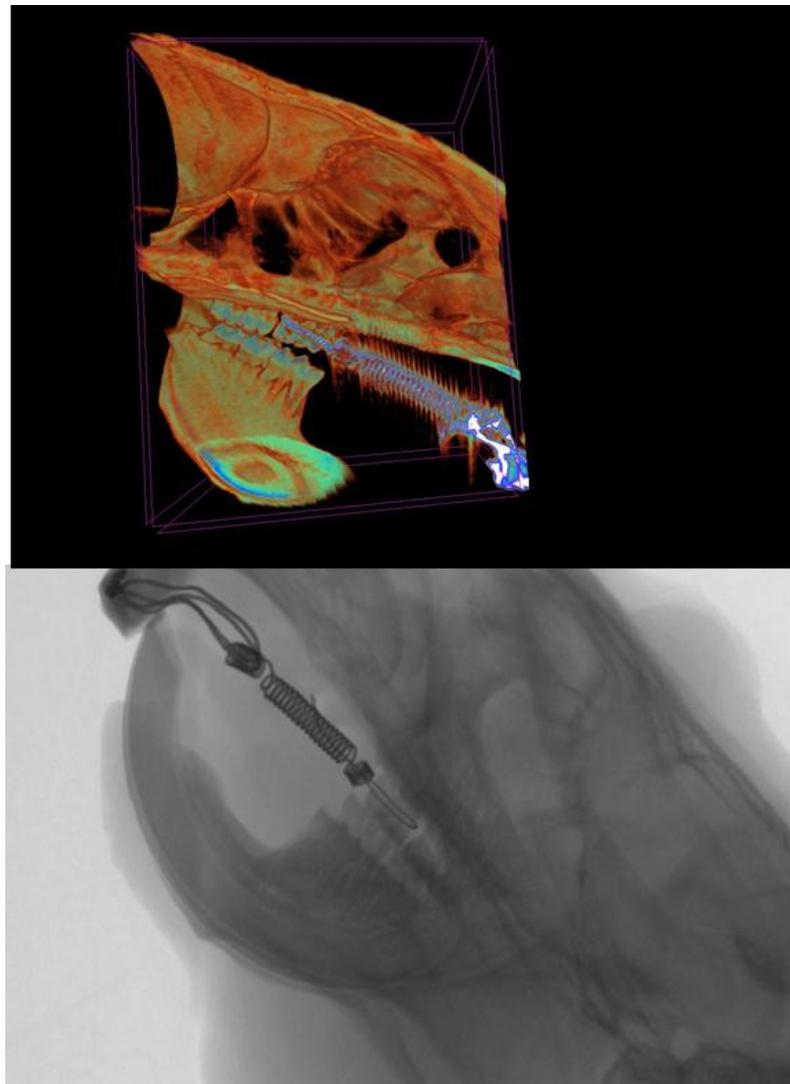


Figura 17: Exemplo de tomadas microtomográficas com mola fechada instalada e a movimentação dentária do primeiro molar superior em direção mesial.

Durante a reconstrução foram geradas 568 reconstruções por animal (Figura 9) (numa única execução microtomográfica), perfazendo 22.720 reconstruções em uma única execução com 40 animais, ou 68.160 reconstruções durante a realização das três tomadas microtomográficas.

5.2 GUIAS DE MENSURAÇÃO

Das 240 imagens escolhidas através do software Data Viewer, foram confeccionados 240 guias de mensuração (Figura 12) utilizando o software Image Pro Plus 5.1 - Media Cybernetics, que foram fundamentais para a aferição das imagens.

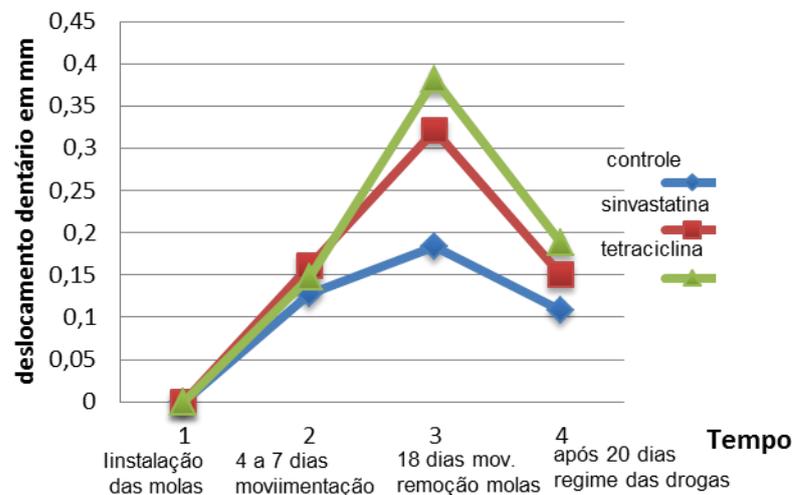
5.3 MÉTODOS DE MENSURAÇÃO

Os dois métodos de mensuração para a recidiva (método das imagens micro-CT e método das imagens reconstruídas) geraram os dados referentes à movimentação e recidiva dentária presentes no apêndice 1.

5.4 IMAGENS MENSURADAS

As 240 imagens que foram mensuradas com o auxílio do software Image Pro Plus 5.1 - Media Cybernetics (Figura 13) geraram os dados relativos à figura 18 e 19, referentes aos dois métodos de aferição do movimento dentário e da sua recidiva.

Média de movimentação das imagens Micro CT



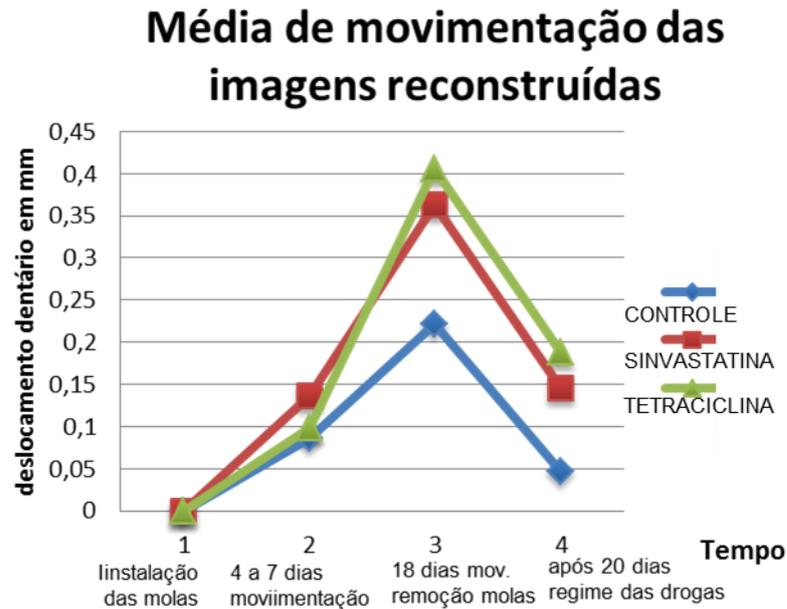


Figura 18 e 19: Média de movimentação das diferentes imagens aferidas: imagens micro CT e reconstruídas respectivamente. Cor azul- representa o grupo controle. Cor vermelha o grupo da sinvastatina. Cor verde representa o grupo das tetraciclina modificadas.

5.5 DADOS DAS MENSURAÇÕES DA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA

Foi observado que os elementos dentários dos murinos movimentaram-se progressivamente até certo limite, após o que (após a remoção das molas) tenderam a retornar ao seu estado original (recidiva) à medida que o regime de tratamento das drogas foi instituído.

Na análise estatística não foi encontrada diferença significativa na comparação entre os três grupos após a movimentação dentária inicial (Rec-inicial, $p=0,935$) e nem no fim da movimentação de 18 dias (Rec-18d, $p= 0,16$), assim como na massa dos animais ($p=0,13$) (Tabela 1).

O grupo das tetraciclina modificadas foi o que apresentou maior média de movimentação dentária, seguido pelo grupo da sinvastatina e do grupo controle, durante o aumento progressivo da tração do primeiro molar superior esquerdo do murinho, que duraram 18 dias (Figura 18 e 19).

A pesar da diferença de movimentação dentária aos 18 dias, nos três grupos estudados, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os três grupos, findo o período de 18 dias de movimentação dentária ($p= 0,075$).

A análise estatística das imagens microtomográficas (micro CT) final não encontrou diferença estatisticamente significativa entre os três grupos estudados ($p= 0,089$) (Tabela 3 e Figura 24).

Porém na análise entre grupos, na movimentação dentária final, Rec-Final, foi encontrada significância estatística entre os três grupos, com $p= 0.048$ (Tabela 3) e Figura 24, e encontrada significância estatística entre o grupo controle e o grupo da tetraciclina modificada, com $p= 0,007$ (Figura 24).

Isto é facilmente visualizado na análise da variação longitudinal da mediana, correspondente ao teste de Kruskal Wallis (Figura 24).

5.6 IMAGENS RECONSTRUÍDAS DA DENSITOMETRIA

Durante a reconstrução foram geradas 747 reconstruções por animal (numa única execução microtomográfica), perfazendo 26.145 reconstruções em uma única execução com 40 animais, ou 78.435 reconstruções durante a realização das três tomadas microtomográficas.

Foram escolhidas 40 imagens de reconstrução microtomográfica relativos à execução de uma única tomada microtomográfica, e através do software Data Viewer, escolhidas 40 imagens no plano sagital, que pudessem ser utilizadas para a confecção das áreas de análise densitometria.

Isto foi realizado para as três tomadas microtomográficas, o que resultou em 120 imagens para a confecção de um círculo de 60 x 60 pixels, que abrangesse a raiz mesial e sua estrutura óssea circunvizinha, com o auxílio do software CT Analyser 1.13 Bruker micro CT, correspondente aos 40 animais nas três tomadas microtomográficas.

5.7 DADOS DAS MENSURAÇÕES DA DENSITOMETRIA

Os dados referentes à densitometria da raiz mesial indicam que a densidade mineral óssea diminuiu progressivamente durante a movimentação dentária induzida, e após a remoção das molas e instituição das drogas nos grupos experimentais, a densidade mineral óssea só aumentou no grupo da tetraciclina modificada (Figuras 22 e 23).

Com relação à densidade mineral óssea na raiz distal, ocorreu um aumento em todos os grupos durante a movimentação dentária induzida, mas após a remoção das molas e instituição das drogas, a densidade óssea diminuiu nos três grupos.

Foi encontrada diferença estatisticamente significativa nas densidades ósseas da raiz mesial e distal entre os três grupos estudados, com $p=0,001$ e $p=0,000$ respectivamente, com teste de pós-hoc de Tukey, afirmando que a inciclínida foi o grupo que diferiu quanto à densidade óssea mineral final entre os três grupos estudados (Tabela 2).

Tabela 1: Características dos grupos

	Grupos			p-valor
	Controle (n = 10)	Sinvastatina (n = 15)	Tetraciclina (n = 15)	
Demograficos				
Genêro M/F (%)	10/0 (100)	15/0 (100)	15/0 (100)	
Peso ^a	350 (320 a 381)	371 (356 a 385)	342 (316 a 368)	0,13*
Avaliação inicial				
Rec_inicial ^b	0,109 (0,0 – 0,155)	0,109 (0,0 – 0,186)	0,109 (0,0 – 0,186)	0,935 [†]
CT_inicial ^b	0,125 (0,109 – 0,154)	0,154 (0,142 – 0,186)	0,154 (0,109 – 0,201)	0,293 [†]
Densid dist_inicial ^c	0,246	0,257	0,258	0,200*
Densid mes inicial ^c	0,241 (0,175 – 0,276)	0,201 (0,149 – 0,249)	0,197 (0,143 – 0,225)	0,293*

^a grama: média (95% Intervalo confiança); ^b REC: imagem Reconstruída; ^b CT: imagem Micro CT; ^c Densidade : g/cm³

* Anova [†] Kruskal-Wallis Test

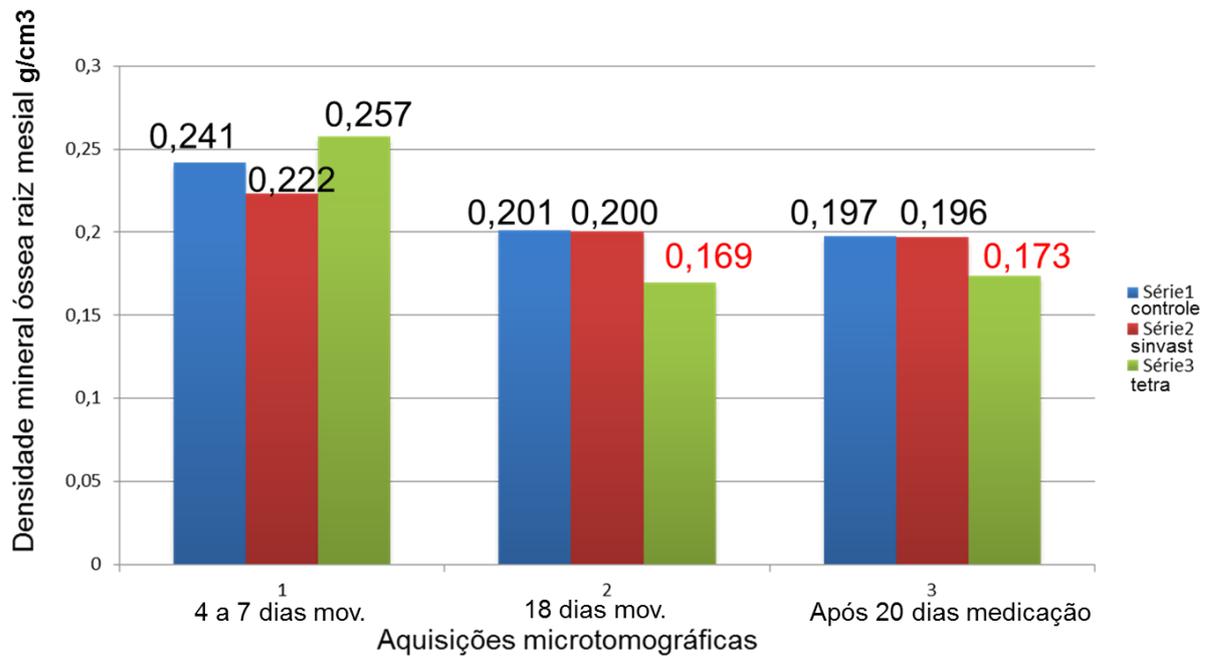


Figura 20: Gráfico da densidade mineral óssea da raiz mesial da primeira (1), segunda (2) e terceira (3) aquisições microtomográficas - a série azul corresponde ao controle, a série vermelha corresponde a sinvastatina e a série verde corresponde a tetraciclina modificada.

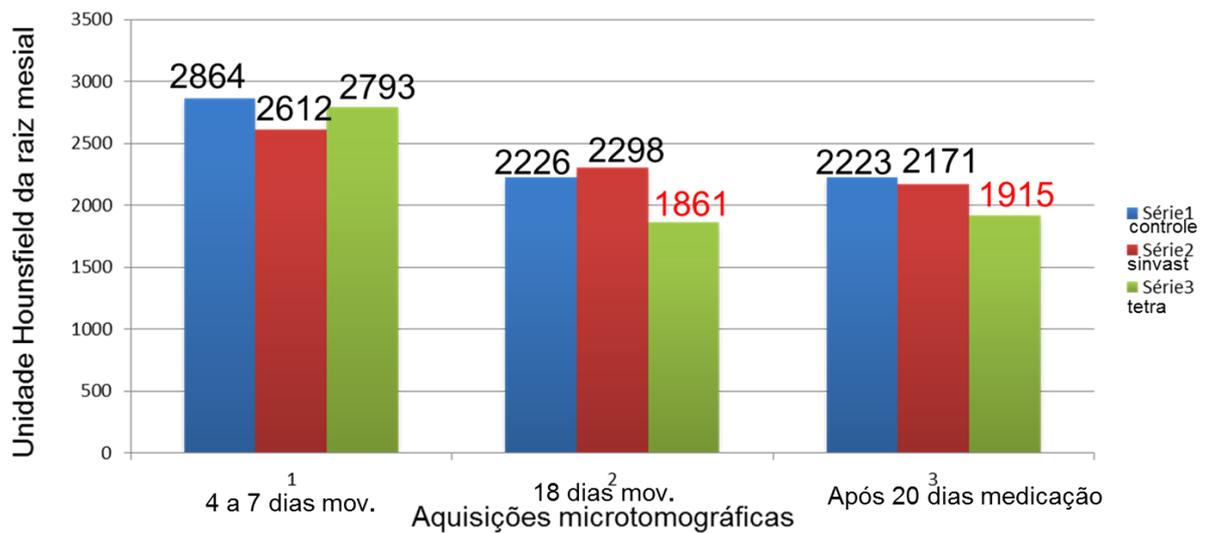


Figura 21: Gráfico da unidade Hounsfield de densidade da raiz mesial da primeira (1), segunda (2) e terceira (3) aquisições microtomográficas- a série azul corresponde ao grupo controle, a série vermelha corresponde ao grupo da sinvastatina, e a série verde corresponde ao grupo da tetraciclina modificada.

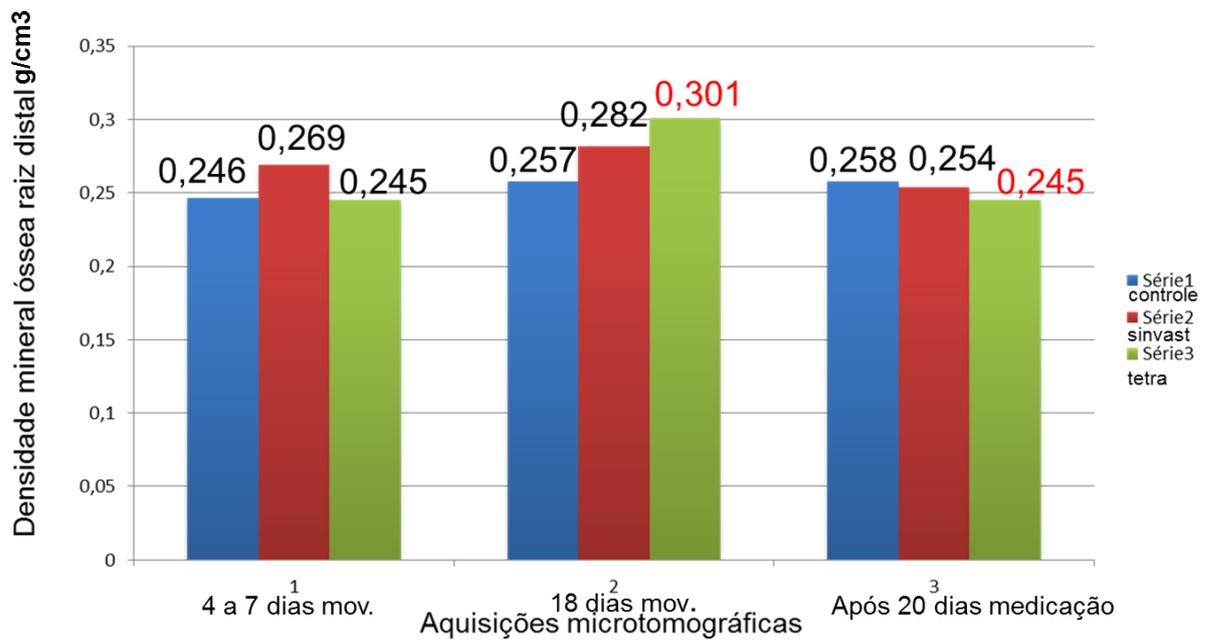


Figura 22: Gráfico da densidade mineral óssea da raiz distal da primeira (1), segunda (2), e terceira (3) aquisições microtomográficas- a série azul corresponde ao grupo controle, a série vermelha corresponde ao grupo da sinvastatina, e a série verde corresponde ao grupo da tetraciclina modificada.

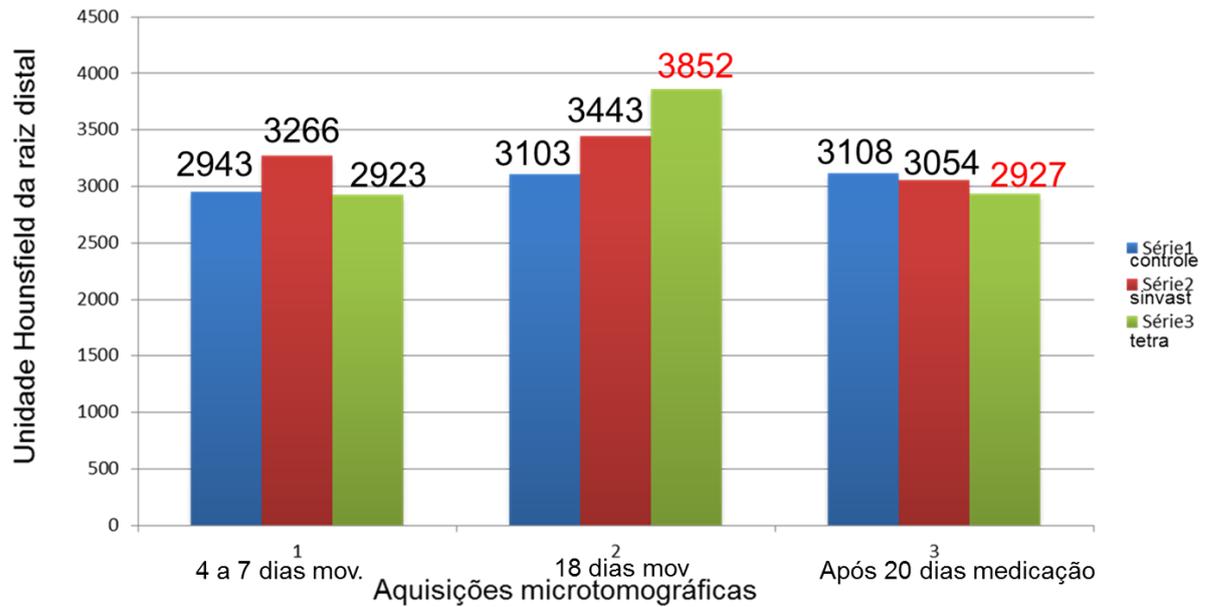


Figura 23: Gráfico da unidade Hounsfield de densidade da raiz distal da primeira (1), segunda (2) e terceira (3) aquisições microtomográficas- a série azul corresponde ao grupo controle, a série vermelha corresponde ao grupo da sinvastatina e a série verde corresponde ao grupo da tetraciclina modificada.

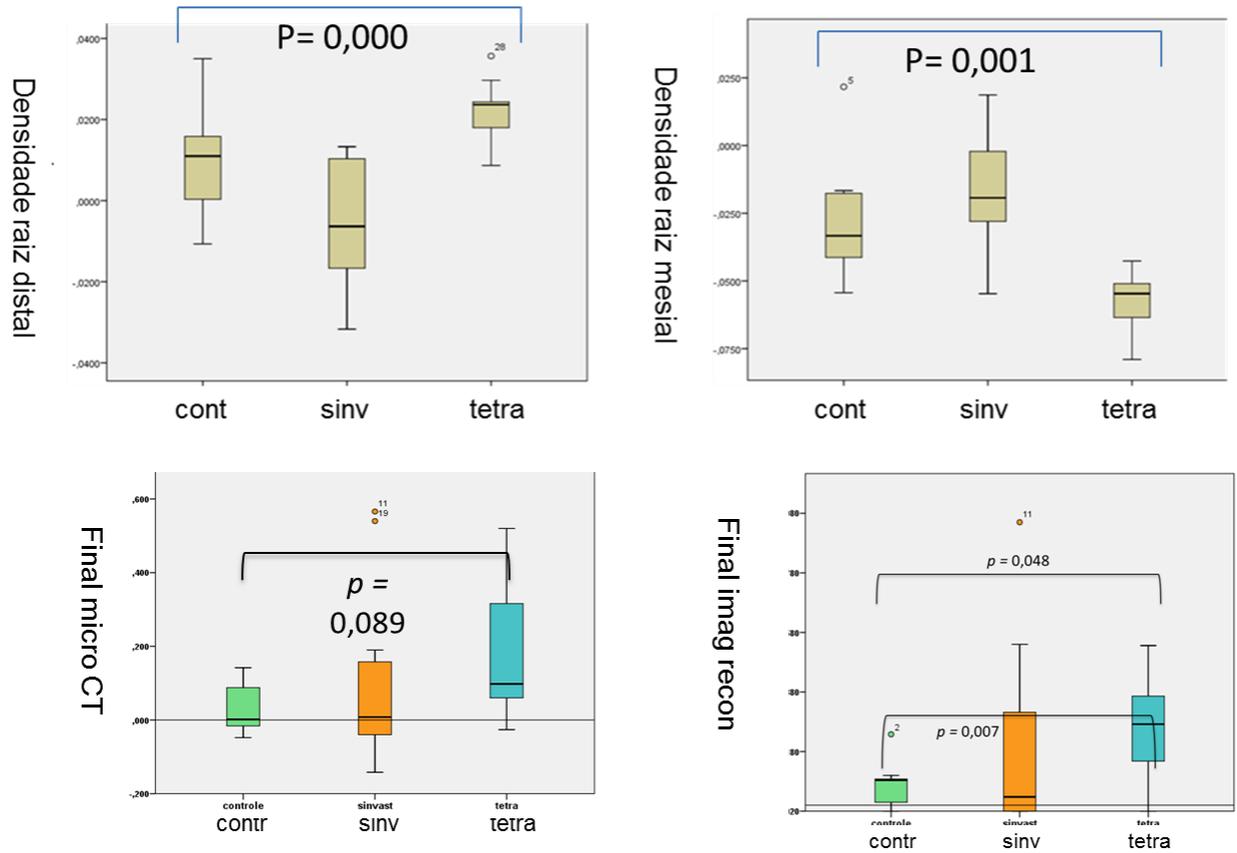


Figura 24: Gráfico Box plot da densidade mineral óssea adjacentes às raízes distal e mesial e da recidiva dentária das imagens micro CT e das imagens reconstruídas (Imag recon) entre os três grupos.

Tabela 2: Densidade mineral óssea final da raiz distal e mesial entre os diversos grupos aferidos.

		Groups					
		Control		Simvastatin		Incyclinide	
BMD: Mesial root	ANOVA	Average	Standart deviation	Average	Standart deviation	Average	Standart deviation
	P-Value	0,000	-0,0284	0,0223	-0,0160	0,0225	-0,0574
BMD: Distal root	ANOVA	Average	Standart deviation	Average	Standart deviation	Average	Standart deviation
	P-Value	0,001	0,0078	0,0148	-0,0052	0,0174	0,0221

Tabela 3: Recidiva entre os diversos grupos aferidos

		Grupos					
		Controle (n = 10)		Sinvastatina (n = 15)		Tetraciclina (n = 15)	
Teste Kruskal – Wallis imagens Reconstruidas P-valor	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
	0,048	0,03155	0,04595	0,08092	0,16352	0,13223	0,09069
Teste Kruskal – Wallis Micro CT P-valor	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
	0,089	0,01322	0,03322	0,04907	0,1154	0,09007	0,08356

Tabela 4: Correlação entre densidade óssea e recidiva ortodôntica.

Grupos			
Spearman Correlação	Final Densidade óssea	Final Imagem Rec	Correlação
Raiz distal P-Value	0.753	0.753	0.061
Spearman Correlação	Final Densidade óssea	Final Imagem Rec	
Raiz mesial P-Value	0.109	0.109	-0.282

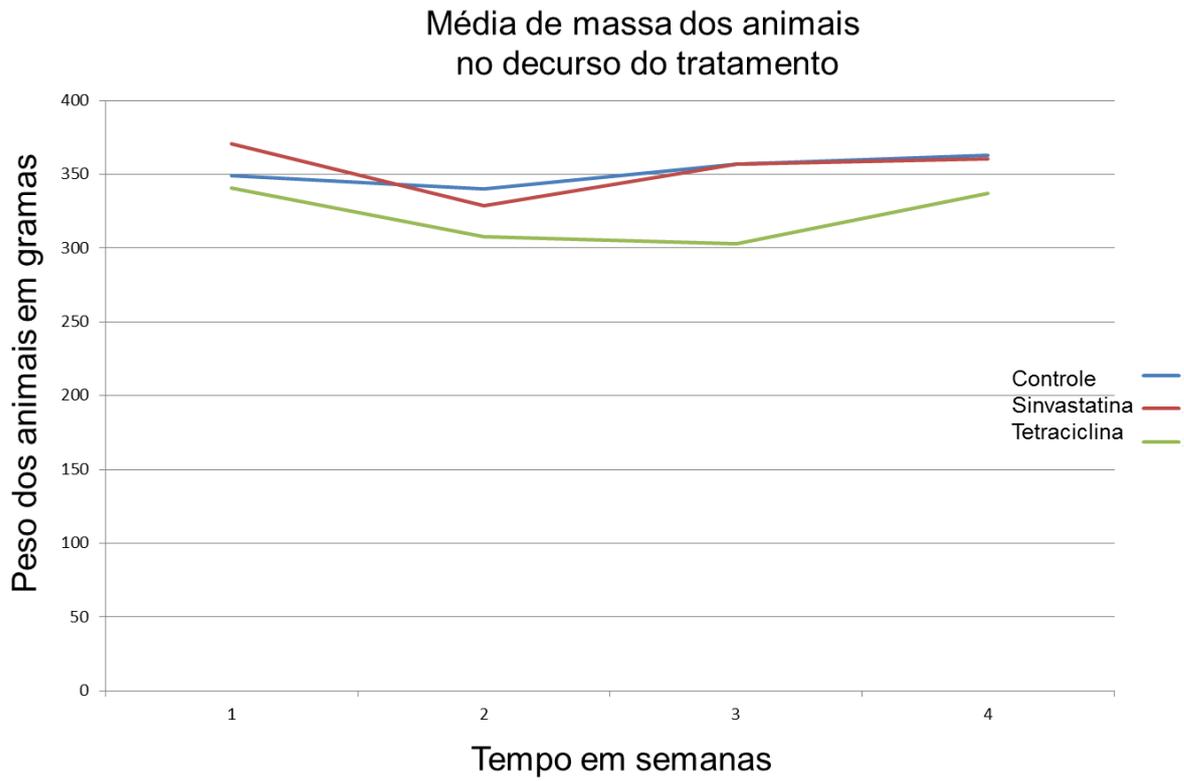
5.10 ALTERAÇÕES DA MASSA DOS ANIMAIS

Os animais sofreram alterações de massa no decorrer do experimento, onde notamos que a média dos pesos dos animais diminui após a instalação das molas, devido à alimentação em forma de ração moída, e a adaptação do dispositivo utilizado, durante os 18 dias de movimentação dentária induzida.

Porém, os animais voltaram a ganhar massa, após a retirada das molas e instituição da ração convencional, voltando à média de peso inicial (Tabela 5).

Foi observado que as drogas ministradas durante o regime de tratamento não alteraram a saúde dos animais, nem interferiram com o ganho de peso dos animais, o que podemos constatar através dos dados da tabela 5.

Tabela 4: Média da massa dos três grupos de animais



6 DISCUSSÃO

No presente experimento ocorreu a inibição da recidiva ortodôntica, após a utilização da inciclinida (CMT-3) durante os 20 dias de retorno à posição original, com a remoção das molas nos animais do grupo experimental. Isto pode ser devido à inibição do número de osteoclastos no lado de compressão, provavelmente por inibição da migração de osteoclastos ou apoptose destas células (BILDT et al; 2007).

Desde que Golub et al., (1983), descobriram o efeito inibitório das tetraciclina (minociclina) na atividade da matriz das metaloproteinases (MMP), foram desenvolvidas tetraciclina modificadas quimicamente (CMTs), com perda da função antimicrobiana, mas que retém atividade anti-MMP. Algumas destas drogas, como a inciclinida (CMT-3), exercem potente inibição enzimática a estas proteínas (ARCHARYA et al., 2004), e também afetam o recrutamento dos osteoclastos (HOLLIDAY et al., 2003, ZHOU et al., 2010).

É postulado que as CMTs possam reduzir a expressão das MMPs, pela inibição competitiva do zinco que atua como cofator da reação enzimática das MMPs, alterando o equilíbrio existente, entre a concentração de MMPS e a concentração do seu inibidor tecidual natural, os TIMPs (ACHARYA et al., 2004). Isto ocorre, pela inativação da ação enzimática destas substâncias, e com isso, coibindo a remodelação da matriz óssea extracelular, sendo já atestado à inibição da movimentação dentária por estas substâncias (BILDT et al., 2007).

As MMPs, que são o alvo da inciclinida, são encontradas em ambos os lados de aposição e reabsorção óssea, durante a movimentação dentária induzida (APAJALAHTI et al., 2003, INGMAN et al., 2005).

Bildt et al (2007), que testou a inibição da movimentação dentária com a CMT3 (inciclinida), concluiu que a força ortodôntica direcionada mesialmente, induz uma maior quantidade de osteoclastos no lado mesial das raízes (lado de pressão), e uma redução de osteoclastos no lado distal das raízes (lado de tensão). Por analogia, podemos inferir o mesmo raciocínio à recidiva, tendo em vista que alguns pesquisadores propuseram que a movimentação dentária e a recidiva têm mecanismos fisiológicos similares (FRANZEN et al., 2013).

Mas foi necessário atestar a correlação destes achados com áreas de densidade óssea, pois para alguns autores a taxa de movimentação dentária é inversamente proporcional à densidade óssea (CHUGH et al., 2013), e tecidos ósseos menos mineralizados são mais facilmente remodelados (BRIDGES et al., 1988).

É necessário um período de tempo de no mínimo 14 dias para um completo ciclo de remodelação do ligamento periodontal em ratos (KING et al., 1991). Mas 20 dias é tempo suficiente para o aparecimento de recidivas dentárias, aferida através de microtomografias, e o aparecimento de áreas de densidade óssea aumentada, que assim como a remodelação óssea, continuam por muitos dias após a remoção dos dispositivos de movimentação induzida (KING et al., 1997).

Segundo Holliday et al., (2003), são criadas áreas de pressão na superfície mesial e áreas de tensão na superfície distal na região do primeiro molar superior direito que está sendo movimentado. O estresse mecânico, imposto pela movimentação ortodôntica no lado de tensão, gera um acréscimo do anabolismo (BUCKLEY et al., 1988) com o aumento da densidade óssea, assim como no lado de pressão há uma elevação na produção de prostaglandinas, interleucinas, que promovem a reabsorção óssea, com a diminuição da densidade óssea local (OSAKA et al. 1990).

Após a movimentação dentária, ocorreu uma diminuição da densidade mineral óssea na raiz mesiovestibular do primeiro molar superior, corroborando os achados de Bridges et al, (1980) e King et al., (1991), sugerindo que a reabsorção óssea em áreas de pressão pode preceder a aposição óssea em áreas de tensão.

Segundo Bridges et al., (1988), há um decréscimo na densidade óssea mineral durante o período tardio da movimentação dentária tanto em ratos jovens como ratos adultos, consistente com a formação de um tecido ósseo imaturo e de baixa densidade.

Porém, na presente pesquisa houve um aumento da densidade mineral óssea na região da raiz distovestibular, do grupo da inciclinida, com um predomínio da aposição óssea após 18 dias de movimentação dentária, em detrimento da reabsorção óssea. Isto talvez seja devido ao tipo de movimento de inclinação do primeiro molar superior, criando áreas de tensão no terço cervical e médio da raiz distovestibular (KING et al., 1991, HOLLIDAY et al., 2003).

Durante o período da recidiva dentária, houve um ligeiro aumento da densidade mineral óssea na raiz mésovestibular (grupo da inciclinida), ao contrário do grupo controle, o que atesta o efeito da inciclinida na osteoclastogênese. Isto ocorreu devido à inibição das metaloproteinases, responsáveis pela degradação da matriz osteóide orgânica, não havendo a possibilidade de ligação dos osteoclastos à superfície óssea (HENNEMAN et al., 2008), tendo alguns autores mostrado que as tetraciclinas também reduzem o número de podossomas nos osteoclastos, debilitando a adesão dos osteoclastos ao tecido ósseo (RIFKIN et al., 1993).

Além disso, as tetraciclinas modificadas atuam na inibição da formação osteoclástica (HOLMES et al., 2004), induzem a apoptose dos osteoclastos (HOLMES et al., 2008), assim como uma redução das MMP9, essencial para a migração destas células através da matriz colágena

(ENQSIG et al., 2000), tendo como ação farmacológica final, a inibição da reabsorção óssea (ZHOU et al., 2010).

Bildt et al., (2007) encontrou uma redução de osteoclastos no lado mesial das raízes submetidas à movimentação dentária, em molares de ratos submetidos à gavagem oral com CMT-3 (30mg/kg). Isto corrobora os achados da presente pesquisa, que também creditou à inibição da recidiva dentária, ao aumento da densidade óssea local na raiz mesial do primeiro molar esquerdo, que foi movimentado, provavelmente a expensas da redução no número de osteoclastos.

Interessante, que na fase da recidiva dentária na raiz distovestibular, ocorreu uma diminuição da densidade óssea na raiz distal ($p < 0,01$), no grupo da inciclinida. E isto talvez sinalize que o efeito inibitório da droga no lado de tensão, não afeta o desequilíbrio da remodelação da matriz extracelular. A densidade mineral óssea desta raiz retornou a valores de magnitude similares ao início da movimentação dentária, ao contrário do grupo controle, cujos valores da densidade óssea continuaram a se elevar. E os nossos achados corroboraram os trabalhos de Zhou et al., (2010), que não encontraram nenhuma ação anabólica das tetraciclinas ou de formação óssea nas células da linhagem osteoblástica, assim como Bildt et al., (2007) que não encontraram diferença estatisticamente significativa no número de osteoclastos entre o grupo controle e o grupo da CMT-3, na raiz distal de molares de ratos movimentados em direção mesial.

Apesar da diminuição da densidade mineral óssea adjacente à raiz distal, no grupo da inciclinida, ocorreu a inibição da recidiva dentária ($p < 0,05$) pela inciclinida, provavelmente a expensas do aumento da densidade óssea adjacente à raiz mesial, como consequência da inibição da reabsorção óssea na região da raiz mésovestibular ($p < 0,01$), referente ao lado de pressão.

Outra droga com vertentes nas diversas fases da remodelação óssea é a sinvastatina, um fármaco que atua como inibidor competitivo da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-Co-a), atuando na síntese do mevalonato (SINGH et al., 2012).

Apesar de a sinvastatina ser uma droga relacionada a fase anabólica ou de neoformação óssea (SINGH et al., 2012), atuando na formação da proteína morfogenética do osso (BMP2) no periodonto (SINGH et al., 2012) (e aumentando a densidade óssea) o seu mecanismo de ação na fase catabólica também é expressivo. Sendo que foi constatada a regulação da diferenciação dos osteoclastos pela sinvastatina (GRASSER et al., 2003), possivelmente através da MMP 9, visto que esta enzima é essencial para recrutamento dos osteoclastos (ENQSIG et al., 2000).

Foi hipotetizado então, que a sinvastatina também possa inibir a recidiva, por inibir o recrutamento de osteoclastos via metaloproteinases. Isto é devido à descoberta da necessidade de um subproduto da via do mevalonato (inibida pela sinvastatina), mais especificamente a geranilgeranil transferase (GGT-1), para que se dê o recrutamento dos osteoclastos (WONG et al,

2001). Então ocorreria a inibição da quimiotaxia e secreção pelos macrófagos das MMP9, o que indiretamente afeta o recrutamento dos osteoclastos pela sinvastatina. A sinvastatina atuaria, portanto na inibição do recrutamento e diferenciação dos osteoclastos, inibindo a remodelação óssea e podendo inibir a recidiva da movimentação dentária.

A aplicação da Sinvastatina foi realizada evitando-se altas doses, pois segundo Singh et al., (2012), altas doses de sinvastatina fogem da prescrição normal, sendo que 10 mg/kg ao dia em ratos é uma alta dose que corresponderia em termos farmacocinéticos, a 70 mg/kg ao dia em humanos, e doses altas de sinvastatina (70 mg/kg) aumentam o risco de insuficiência hepática, doenças renais, rabdomiólise e mialgia (JADHAV et al., 2006). Portanto foi adotada a dose oral de 5 mg/kg ao dia em ratos, equivalente a 20 a 40 mg da dose diária normalmente utilizada em humanos.

Foram encontrados valores de densidade óssea diminuída na região da raiz mesiovestibular, assim como da raiz disto vestibular. Isto pode ser devido a via de administração utilizada para a droga em questão. E contrariando estudos de Han et al., (2010) que achou inibição da recidiva dentária com a sinvastatina (e propôs um mecanismo de controle da taxa local de osteoprotegerina pela droga), a sinvastatina não inibiu a recidiva dentária no presente experimento.

O trabalho de Han et al., (2010) que estudou o efeito da sinvastatina na recidiva da movimentação dentária em ratos, preconizou uma dose menor, de 2,5 mg, mas com uma via de administração mais efetiva (intraperitoneal), o que pode ter contribuído para uma melhor absorção da droga e manutenção de níveis plasmáticos mais adequados nos espécimes estudados. Porém, o risco de crostas ou escaras na pele circundante, devido às injeções locais diárias da droga (TYLIN et al., 2002), em um período longo, viabilizou a adoção da via oral como a mais adequada para um estudo durante este tempo de observação.

Apesar disto, existem trabalhos que atestam que a sinvastatina não é bem absorvida, e menos que 5% da droga encontram-se na circulação sanguínea, após a aplicação por via oral (PARK et al., 2009). Porém, também está bem fundamentado que osteoblastos e osteoclastos podem ser bem expostos a baixas concentrações por via oral (PARK et al., 2009).

O método de aferição utilizado por Han et al., (2010) é mais factível de falha, tendo em vista que se utilizou de moldagens intra-orais, que após serem vazadas com gesso especial, foram escaneados e transferidas para um programa de computador editor de fotos, para a aferição das mensurações decorrentes da movimentação dentária induzida.

As várias etapas do processo de transferência são mais propensas a falhas do que uma análise direta em imagens tomográficas em escala real. E programas de edição de fotografias, não têm acurácia suficiente, por não serem softwares fabricados especialmente para aferições precisas

em escala adequada, comparado à sofisticação de softwares de processamento de imagem, cuja ferramenta de análise propicia medição avançada de imagens microscópicas e radiográficas, sem a necessidade da utilização do macro.

Esfahani et al., (2013) utilizou a mesma dosagem e via de administração em ratos, 2,5 mg por via intraperitoneal, e encontrou inibição da movimentação dentária com a sinvastatina. Mas foi utilizado um paquímetro digital (diretamente na boca dos animais), entre os incisivos e primeiros molares, o que limita em muito a acurácia e precisão das mensurações realizadas, inclusive pela extrusão e inclinação nos molares decorrentes da movimentação dentária induzida (GONZALES et al., 2009), além da contínua erupção dos incisivos, típica dos animais roedores (BURN et al., 1999).

A sinvastatina inibe os subprodutos da via do mevalonato, especificamente os isoprenóides farnesil difosfato (15 carbonos) e o geranylgeranyl difosfato (20 carbonos), que têm afinidade de ligação pelos carbonos terminais de pequenas proteínas ligantes chamadas GTP, formando as chamadas proteínas prenilhadas citossólicas. Um exemplo destas proteínas prenilhadas são as Rac e Rho, que são essenciais na ativação da polarização e motilidade celular, incluindo os macrófagos e os osteoclastos (MARITZ et al., 2001).

Os bisfosfonatos também inibem a predinilação, inibindo a função osteoclástica e reabsorção óssea, e cogitou-se que a sinvastatina teria efeito similar (SUGIYAMA et al., 2000), mas assim haveria um aumento na densidade óssea mineral após a aplicação da droga, levando-se em conta o efeito da droga na vertente catabólica do tecido ósseo.

Porém, outra pesquisa constatou que em baixas doses (1,0mg/kg a 5,0mg/kg), a sinvastatina exibe efeito de diminuição da densidade óssea mineral em ratos, com decréscimo da formação óssea e aumento da reabsorção óssea (MARITZ et al., 2001).

Os resultados da presente pesquisa confirmam os achados de Maritz et al., (2001), e Park (2009), que constataram diminuição da deposição óssea e aumento da reabsorção óssea com diminuição de densidade óssea mineral, com a utilização de baixas doses de sinvastatina (1,0mg/kg a 5mg/kg).

Segundo estes autores, somente com altas doses de sinvastatina (20mg/kg) haveria um aumento na formação óssea, com alguma mudança na taxa da densidade óssea mineral (MARITZ et al., 2001; PARK, 2009). Os osteoblastos seriam preferencialmente estimulados, com a manutenção ou o aumento da densidade mineral óssea (MARITZ et al., 2001).

E esta discrepância na resposta da remodelação óssea as doses administradas de sinvastatina, poderia ser explicada, segundo estes autores, pela diferença de sensibilidade entre as

células responsáveis pela formação e destruição do tecido ósseo, com maior sensibilidade pelos osteoclastos ao fármaco sinvastatina (MARITZ et al., 2001), que apresentaria um efeito diferente das predinilação, constatado pelo estudo da droga *in vitro* (SUGIYAMA et al., 2000).

Isto também ocorre com os bisfosfonatos, que também inibem a predinilação, mas cujos efeitos nas células osteoclásticas são dependentes da dosagem da droga. O EB-1053 inibe as funções dos osteoclastos em doses normais, mas em baixa dosagem aumenta a função osteoclástica (VAN DER PLUIJM et al., 1992). O que poderia explicar a diminuição da densidade mineral óssea a sinvastatina nos espécimes estudados.

Interessante, que como a diminuição da densidade mineral óssea não foi significativa entre os grupos controle e o grupo da sinvastatina (sendo estatisticamente insignificante), a taxa de reabsorção também não se apresentou acelerada, com aumento do *turnover* catabólico, a ponto de aumentar a recidiva da movimentação dentária induzida no grupo da sinvastatina, comprovada estatisticamente pela análise das microtomografias CT, e pela inexistência da correlação entre as variáveis recidiva dentária e densidade óssea.

E só haveria, teoricamente, a inibição da recidiva da movimentação dentária induzida, com uma diminuição da taxa de reabsorção óssea mineral, decorrente provavelmente da inibição dos osteoclastos e estímulo dos osteoblastos, tendo como consequência, um aumento da densidade óssea mineral e da formação óssea, o que de fato não ocorreu na pesquisa em questão.

O presente trabalho apresenta limitações devido a necessidade de corroborar os achados da recidiva dentária e da densidade mineral óssea e a sua unidade quantitativa Hounsfield, com achados histopatológicos e imunohistoquímicos, em especial com dados semi-quantitativos das metaloproteinases no lado de pressão e tensão da raiz mesial e distal do primeiro molar superior esquerdo, além da contagem de osteoclastos nas regiões adjacentes a estas raízes.

As perspectivas futuras para a implementação do controle da recidiva dentária por medicamentos, necessita de adequação quanto a posologia adequada em seres humanos, tendo em vista que o metabolismo acelerado dos ratos atrapalhe uma analogia mais precisa da dose ótima a ser utilizada em humanos.

A meia vida de 53,7 horas da inciclinida é uma vantagem considerável em relação a meia vida de apenas 3 horas da sinvastatina, devido a manutenção de níveis plasmáticos do princípio ativo desta droga, em maior tempo na circulação sanguínea, além da diminuição de efeitos de toxicidade por ingestão repetidas de fármacos em um curto período de tempo.

Porém há que se ater que a inciclinida atua preponderantemente na fase catabólica da movimentação dentária, e sua ação na fase anabólica é nula (ZHOU et al., 2010), ao contrário da sinvastatina, que atua enfaticamente na fase anabólica (SINGH et al., 2012).

Talvez, a conjugação destas duas propriedades farmacológicas possa ser factível através da utilização concomitante destas duas drogas, a inciclinida e a sinvastatina, em pacientes pós-tratamento ortodôntico, para a inibição absoluta da recidiva da movimentação dentária, trazendo grandes benefícios e maior credibilidade à ciência ortodôntica.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A droga tetraciclina modificada inciclinida (CMT-3) inibiu a recidiva da movimentação dentária no método de mensuração de maior acurácia das imagens reconstruídas.

A densidade final da raiz mesial do grupo da inciclinida (CMT-3) apresentou um aumento de densidade mineral óssea em relação aos demais grupos, e este valor foi estatisticamente significativo.

A densidade final da raiz distal do grupo da inciclinida (CMT-3) apresentou uma diminuição da densidade mineral óssea, ao contrário do grupo controle que apresentou valores de densidade mineral óssea idênticos ao início da movimentação dentária, e este valor foi estatisticamente significativo.

A droga sinvastatina não inibiu a recidiva da movimentação dentária tanto no método de maior acurácia das imagens reconstruídas quanto no método de menor acurácia das imagens micro-CT.

A densidade final da raiz mesial e distal do grupo da sinvastatina apresentou uma diminuição da densidade mineral óssea em relação ao grupo controle.

Não foi encontrada correlação estatística entre a densidade mineral óssea final e a recidiva da movimentação dentária induzida.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA MR, VENITZ J, FIGG WD, SPARREBOOM A. Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. **Drug Resist Updat** 2004; 7(3):195-208.
- ANGOLKAR V. P, ARNOLD V. J, NANDA S. R. Force degradation of closed coil springs: An in vitro evaluation. **Am J Orthod Dentofacial Orthop** 1992;102(2):127–133.
- APALAJAHIT S, SORSA T, RAILAVO S, INGMAN T. The in vivo Levels of matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid During initial orthodontic tooth movement. **J Dent Res** 2003;82(12):1018-1022.
- BAEK KH, LEE WY, OH KH, TAE HJ, LEE JM, LEE EJ, HAN JH, KHANG MI, CHA BY, LEE KH, SON HY, KANG SK. The effect of simvastatin on the proliferation and differentiation on human bone marrow stromal cells. **J Korean Med Sci** 2005;20(3) 438-444.
- BALDWIN P D, PENDER N, LAST K S. Effects on tooth movement of force delivery from nickel titanium archwires. **Eur J Orthod** 1999;21(5):481-489.
- BILDT MM, SNOEK-VAN BEURDEN AMP, DEGROOT J, VAN EL B, KUIJPERS-JAGTMAN AM, VON DEN HOFF JW. Chemically modified tetracyclines stimulate matrix metalloproteinase-2 production by periodontal ligament cells. **J Periodontal Res** 2006;41(5):463–470.
- BILDT M. M, HENNEMAN S, MALTHA C. J, KUIJPERS-JAKTMAN M. A, VON DER HOOFF W. J. CMT-3 inhibits orthodontic tooth displacement in the rat. **Arch Oral Biol** 2007;52(6):571-578.
- BILDT M.M., BLOEMEN M, KUIJPERS-JAGTMAN A.M, VON DEN HOFF W.J. Matriz metalloproteinase inhibitors reduce collagen gel contraction and α -smooth muscle actin expression by periodontal ligament cells. **J Periodontal Res** 2009;44(2):266-274.
- BRIDGES T KING G, MOHAMMED A. The effect of age on tooth movement and mineral density in the alveolar tissues of the rat. **Am J Orthod Dentofacial Orthop** 1988;93(3):245-50.
- BUCKLEY MJ, BANES AJ, LEVIN LG, SUMPPIO BE, SATO M, JORDAN R. Osteoblasts increase their rate of division and align in response to cyclic, mechanical tension in vitro. **Bone Miner** 1998;4(3):225-236.
- BURN-MURDOCK R.A. The length an eruption rates of incisors teeth in rats after one or more them had been unimpeded. **Eur J Orthod** 1999; 21(1):49-56.
- CHUGY T, JAIN AK, JAISWAL RK, MEHROTRA P, MEHROTRA R. Bone density and it is importance in orthodontics. **J Oral Biol Craniofac Res** 2013;3(2):92-97.
- DESTANG DL, KERR WJS. Maxillary retention: is longer better? **Eur J Orthod** 2003; 25(1):65–69.
- DUNN MD, PARK CH, KOSTENUIK PJ, KAPILA S, GIANNOBILE WV. Local delivery of osteoprotegerin inhibits mechanically mediated bone modeling in orthodontic tooth movement. **Bone** 2007;41(3):446-55.
- ENQSIG MT, CHEN QJ, VU TH, PEDERSEN AC, THERKIDSEN B, LUND LR, HENRIKSEN K, LENHARD T, FOGED NT, WERB Z, DELAISSÉ JM. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. **J Cell Biol** 2000;151(4):879-889.
- ESFAHANI N.E.A, SADEGHIAN S, RAZAVI S.M, MINAIYAN M, AFSARI E. The Effects of Simvastatin on Bone Remodeling, Tooth Movement and Root Resorption in Orthodontic Treatments. **Biomed Pharmacol J** 2013;6(2):271-278.

- FRACALOSSO C. C. A, SANTAMARIA J. M, CONSOLARO O. M. F. M. Movimentação dentária experimental em murinos: período de observação e plano dos cortes microscópicos. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial** 2009;14(1):143-157.
- FRANZEN JT, BRUDVIK P, RADUNOVIC VV. Periodontal tissue reaction during orthodontic relapse in rat molars. **Eu J Orthod** 2013;35(2):152-159.
- GONZALES C, HOTOKEZAKAB H, ARAIC Y, NINOMIYAD T, TOMINAGAA J, JANGA I, HOTOKEZAKA Y, TANAKA M, YOSHIDA N. An In Vivo 3D Micro-CT Evaluation of Tooth Movement After the Application of Different Force Magnitudes in Rat Molar. **Angle Orthod** 2009;79(4):703-714.
- GOLUB LM, LEE HM, LEHRER G. Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. **J Periodontal Res** 1983;18(5):516-526.
- GOLUB LM, RAMAMURTHY NS, McNAMARA TF, GREENWALD RA, RIFKIN BR. Tetracyclines Inhibit Connective Tissue Breakdown: New Therapeutic Implications for an Old Family of Drugs. **Crit Rev Oral Biol Med** 1991;2(3):297-321.
- GOLUB LM, LEE HM, RYAN ME, GIANNOBILE WV, PAYNE J, SORSA T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. **Adv Dent Res** 1998;12(2):12-26.
- GRASSER W.A, BAUMANN A.P, HARWOOD H.J, DEVALARAJA R, RENKIEWICZ R, BARAGI V, THOMPSON D.D, PARALKAR V.M. Regulation of osteoclast differentiation by statins. **J Musculoskel Neuron Interact** 2003;3(1):53-62.
- GRIFFIN MO1, FRICOVSKY E, CEBALLOS G, VILLARREAL F. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. **Am J Physiol Cell Physiol** 2010;299(3):C539-48.
- GU Y, LEE HM, SIMON SR, GOLUB LM. Chemically modified tetracycline-3 (CMT-3): a novel inhibitor of the serine proteinase, elastase. **Pharmacol Res.** 2011;64(6):595-601.
- HAN G, CHEN Y, HOU J, LIU C, CHEN C, ZHUANG J, MENG W. Effects of simvastatin on relapse and remodeling of periodontal tissues after tooth movement in rats. **Am J Orthod Dentofacial Orthop** 2010;138(5):550-557.
- HASSAN AH, AL-HUBAIL A, AL-FRAIDI AA. Bone inductive proteins to enhance postorthodontic stability. **Angle Orthod** 2010;80(6):1051-60.
- HASSAN M.H, ELGAYAR M. A, IBRAHIM M. T, AL-GAYYAR H. M. Anti-inflammatory Effect of Simvastatin-Aspirin Combination. **Int J Pharm Sci Drug Res** 2011;3(2):89-96.
- HELLER I. J, NANDA R. Effect of alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. An experimental study. **Am J Orthod** 1979;75(3):239-258.
- HENNEMAN S, VON DEN HOFF JW, MALTHA JC. Mechanobiology of tooth movement. **Eu J Orthod** 2008;30(3):299-306.
- HIRATE Y, YAMAGUCHI M, KASAI K. Effects of relaxin on relapse and periodontal tissue remodeling after experimental tooth movement in rats. **Connect Tissue Res.** 2012;53(3):207-19.
- HOFBAUER LC, KHOSLA S, DUNSTAN CR, LACEY DL, BOYLE WJ, RIGGS BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. **J Bone Miner Res** 2000;15(1):2-12.

- HOLLIDAY LS, VAKANI A, ARCHER L, DOLCE C. Effects of metalloproteinase inhibitors on bone resorption and orthodontic tooth movement. **J Dent Res** 2003; 82(9):687-691.
- HOLMES SG, STILL K, BUTTLE DJ, BISHOP NJ, GRABOWSKI PS. Chemically modified tetracyclines act through multiple mechanisms directly on osteoclast precursors. **Bone** 2004;35(2):471-478.
- HOLMES S, SMITH S, BORTHWICK L, DUNFORD J, ROGERS M, BISHOP N, GRABOWSKI PS. CMT3 alters mitochondrial function in murine osteoclast lineage cells. **Biochem Biophys Res Commun** 2008; 365(4):840-845.
- HOUSTON WJB. A new design of rat mouth prop. **J Dent Res** 1964;43(3):458.
- HOUSTON, W. J. B, The analysis of errors in orthodontic measurements. **Am J Orthod** 1983;83(5):383-390.
- HOUSHMAND B, HASSANIZADE R, ESLAMI B, AMOUUEI S, DASHTI G, MORAD G, KHOJASTEH A. Simvastatin and Lovastatin induce ectopic bone formation in rat subcutaneous tissue. **J Periodontol Implant Dent** 2010;2(1):12-16.
- HSU JT, CHANG HW, HUANG HL, YU JH, LI YF, TU MG. Bone density changes around teeth during orthodontic treatment. **Clin oral Invest** 2011;15(4):511-519.
- IGARASHI K, MITANI H, ADACHI H, SHINODA H. Anchorage and retentive effects of a bisphosphonate (AHBuBP) on tooth movements in rats. **Am J Orthod Dentofacial Orthop** 1994;106(3):279-89.
- INGMAN T, APAJALAHIT S, MANTYLA P, SAVOLAINEN P, SORSA T. Matriz metalloproteinase 1 and 8 in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a pilot study during 1 month of follow-up after fixed appliance activation. **Eur J Orthod** 2005;27(2):202-207.
- JABBARI M, ZOHREH ROSTAMI J, JENABI A, ZAHEDI-SHOOLAMI L, MOORAKI A. Simvastatin Ameliorates Gentamicin-Induced Renal Injury in Rats. **Saudi J Kidney Dis Transpl** 2011;22(6):1181-1186.
- JADHAV SB, JAIN GK. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. **J Pharm Pharmacol** 2006;58(1):3-18.
- JOBIN C. F, SCHWARTSMANN G, XAVIER L. N, UCHOA M. D, SACILOTO M, CHEMELO N. Expression of MMP-9 and VEGF in breast cancer: correlation with other prognostic indicators. **Rev Bras Ginecol Obstet** 2008;30(6):287-93.
- KAIPATUR NR, WU Y, ADEEB S, STEVENSON TR, MAJOR PW, DOSCHAK MR. Impact of bisphosphonate drug burden in alveolar bone during orthodontic tooth movement in a rat model: a pilot study. **Am J Orthod Dentofacial Orthop** 2013;144(4):557-67.
- KANZAKI H, CHIBA M, TAKAHASHI I, HARUYAMA N, NISHIMURA M, MITANI H. Local OPG gene transfer to periodontal tissue inhibits orthodontic tooth movement. **J Dent Res** 2004;83(12):920-5.
- KASTEN TP, COLLIN-OSDOBY P, PATEL N, OSDOBY P, KRUKOWSKI M, MISKO TP, STELLE SL, CURRIE MG, NICKOLS GA. Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. **Pro Natl Acad Sci** 1994;91(9):3569-3573.
- KILICA N, OKTAY H, ERSOZ M. Effects of force magnitude on relapse: An experimental study in rabbits. **Am J Orthod and Dentofacial Orthop** 2011;140(1): 44-50.
- KIM TW, YOSHIDA Y, YOKOYA K, SASAKI T. An ultrastructural study of the effects of bisphosphonate administration on osteoclastic bone resorption during relapse of experimentally moved rat molars. **Am J Orthod Dentofacial Orthop** 1999;115(6):645-53.

- KING GJ, KEELING SD, WRONSKI TJ. Histomorphometric study of alveolar bone turnover in orthodontic tooth movement. **Bone** 1991;12(6):401-409.
- KING GJ, LATTA L, RUTENBERG J, OSSI A, KEELING SD. Alveolar bone turnover and tooth movement in male rats after removal of orthodontic appliances. **Am J Orthod Dentofacial Orthop** 1997;111(3):266-75.
- KERRIGAN J. J, MANSEL J. P, SANDY J. R. Matrix turnover. **J Orthod** 2000;27(3):227-233.
- KRISHNAN V, DAVIDOVITCH Z. Cellular, molecular and tissue-level reactions to orthodontic force. **Am J Orthod Dentofacial Orthop** 2006;129(4):469-501.
- KYRKANIDES S, O'BARION M K, SUBTELNY J D. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in orthodontic tooth movement: metalloproteinase activity and collagen synthesis by endothelial cells. **Am J Orthod Dentofacial Orthop** 2000;118(2):203-209.
- LI J, HUNYNH H, CHAN E. Evidence for dissolution rate-limited absorption of col-3, a matrix metalloproteinase inhibitors, leading to the irregular absorption profile in rats after oral administration. **Pharm Res** 2002;19(11):1665-1662.
- LI J, SAROSI I, YAN XQ, MORONY S, CAPPARELLI C, TAN HL, MCCABE S, ELLIOTT R, SCULLY S, VAN G, KAUFMAN S, JUAN SC, SUN Y, TARPLEY J, MARTIN L, CHRISTENSEN K, MCCABE J, KOSTENUIK P, HSU H, FLETCHER F, DUNSTAN CR, LACEY DL, BOYLE WJ. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. **Proc Natl Acad Sci** 2000;97(4):1566-71.
- LIU ZJ, KING GJ, STEWART DR. Effect of relaxin on the physical properties of periodontal ligament in the rat. **J Dent Res** 2004;83:2594.
- LLAVANERAS A, RAMAMURTHY NS, HEIKKILÄ P, TERONEN O, SALO T, RIFKIN BR, RYAN ME, GOLUB LM, SORSA T. A combination of a chemically modified doxycycline and a bisphosphonate synergistically inhibits endotoxin-induced periodontal breakdown in rats. **J Periodontol** 2001;72(8):1069-77.
- MCGORRAY SP, DOLCE C, KRAMER S, STEWART D, WHEELER TT. A randomized, placebo-controlled clinical trial on the effects of recombinant human relaxin on tooth movement and short-term stability. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**. 2012;141(2):196-203.
- MADAN MS, LIU ZJ, GU GM, KING GJ. Effects of human relaxin on orthodontic tooth movement and periodontal ligaments in rats. **Am J Orthod Dentofacial Orthop** 2007;131(1):8.e1-10.
- MAEDA T, MATSUNUMA A, KURAHASHI I, YANAGAWA T, YOSHIDA H, HORIUCHI N. Induction of osteoclasts differentiation indices by statin in MC3T3-E1 cells. **J Cell Biochem** 2004;92(3):458-471.
- MAKELA M, SORSA T, UITTO VJ, SALO T, TERONEN O, LARJAVA H. The effects of chemically modified tetracyclines (CMTs) on human keratinocyte proliferation and migration. **Adv Dent Res** 1998;12(2):131-135.
- MALDONATO B. V. Efeitos Microscópicos do Ácido Acetilsalicílico (Aspirina) e do Acetaminofeno (Tylenol) na Movimentação Dentária Induzida e nas Reabsorções Radiculares Associadas. Dissertação de mestrado da Universidade de São Paulo USP-Ribeirão Preto, 2009.
- MANGAZINI L. A, WONG M. A, AHMED K. M. Forces of Various Nickel Titanium Closed Coil Springs. **Angle Orthod** 2010;80(1):182-187.
- MARITZ F.J, CONRADIE M.M, HULLEY P.A, GOPAL R, HOUGH S. Effect of Statins on Bone Mineral Density and Bone Histomorphometry in Rodents. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2001;21(10):1636-1641.

MELROSE C, MILLETT DT. Toward a perspective on orthodontic retention? **Am. J Orthod dentofacial Orthop** 1998;113(5):507-514.

MOOKERJEE I, UNEMORI EN, DU XJ, TREGGAR GW, SAMUEL CS. Relaxin modulates fibroblast function, collagen production, and matrix metalloproteinase-2 expression by cardiac fibroblasts. **Ann N Y Acad Sci** 2005;1041:190-3.

MUNDY G, GARRET R, HARRIS S, CHAN J, CHEN D, ROSSINI G, BOYCE B, ZHAO M, GUTIERREZ G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science** 1999;289(5446):1946-1949.

NASSAR PO, NASSAR CA, GUIMARÃES MR, AQUINO SG, ANDIA DC, MUSCARA MN, SPOLIDORIO DMP, ROSSA Jr C, SPALIDORIO LC. Simvastatin therapy in cyclosporine A induced alveolar bone loss in rats. **J Periodont Res** 2009;44(4):479-488.

NATTRASS C, IRELAND J. A, SHERRIFF. The effect of environmental factors on elastomeric chain and nickel titanium coil springs. **Eur J Orthod** 1998;20(2):169-176.

OLIVE RJ, BASFORD KE. A longitudinal index study of orthodontic stability and relapse. **Aust Orthod J** 2003;19(2):47-55.

OZAWA H, IMAMURA K, ABE E, TAKAHASHI N, HIRAIDE T, SHIBASAKI Y. Effect of a continuously applied compressive pressure on mouse osteoblast like cells (MCT3-E10) in vitro. **J Cell Physiol** 1990;42:177-185.

PARK BJ. The use of simvastatin in bone regeneration. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal** 2009;14(9):85-88.

PARKER GR. Transseptal fibers and relapse following bodily retraction of teeth: a histological study. **Am J Orthod** 1972;61(4):331-344.

RAMAMURTHY SN, RIFKIN RB, GREENWALD AR, XU WJ, LIU Y, TURNER G, GOLUB ML, VERNILLO TA. Inhibition of matrix metalloproteinase-mediated periodontal bone loss in rats: a comparison of 6 chemically modified tetracyclines. **J Periodontol** 2002;73(7):726-734.

REDLICH M, SHOSHAN S, PALMON A. Gingival response to orthodontic force. **Am J Orthod Dentofacial Orthop** 1999;116(2):152-158.

REITAN K. Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. **Am J Orthod** 1967;53(10):721-745.

RIFKIN BR, VERNILLO AT, GOLUB LM. Blocking periodontal disease progression by inhibiting tissue-destructive enzymes: a potential therapeutic role for tetracyclines and their chemically-modified analogs. **J Periodontol** 1993;64(8):819-27.

SADOWSKY C, SCHNEIDER BJ, BEGOLE EA, TAHIR E. Long-term stability after orthodontic treatment: nonextraction with prolonged retention. **Am J Orthod Dentofacial Orthop** 1994;106(3):243-249.

SINGH K. S, DODWARD V, DHARIWAL G. Simvastatin and periodontal regeneration. **J Pharm Biomed Sci** 2012;21(25):1 - 4.

SHIRAZI M, NILFOROUSHAN D, ALQHASI H, DEHPOUR AR. The role of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. **Angle Orthod** 2002;72(3):211-215.

SORSA T, INGMAN T, MIKKONEM T, SUOMALAINEM K, GOLUB L M, THESLEFF I. Characterization of interstitial collagenase in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth

movement in man. In Davidovitch Z (ed.) the biological mechanisms of tooth movement and craniofacial adaptation. Ohio State University College of Dentistry, Columbus, Ohio, 2002; p.47-51.

SOUTHARD TE, SOUTHARD KA, TOLLEY EA. Periodontal force: A potential cause of relapse. **Am J Orthod Dentofacial Orthop** 1992;101(3):221-227.

STOYANOVA II, LAZAROV NE. Localization of nitric oxide synthase in rat trigeminal primary afferent neurons using NADPH-diaphorase histochemistry. **J Mol Histol**, 2005;36(3):187-193.

SUDA T, TAKAHASHI N, UDAGAWA N, JIMI E, GILLESPIE MT, MARTIN TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. **Endocr Rev** 1999;20(3):345-57.

SUGIYAMA M, KODAMA T, KONISHI K, ABE K, ASAMI S, OIKAWA S. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. **Biochem Biophys Res Commun** 2000;271(3):688-692.

SUNYER T, ROTHE L, KIRSCH D, JIANG X, ANDERSON F, OSDOBY, COLLIN-OSDOBY P. Ca²⁺ or phorbol ester but not inflammatory stimuli elevate inducible nitric oxide synthase messenger ribonucleic acid and nitric oxide (NO) release in avian osteoclasts: autocrine NO mediates Ca²⁺-inhibited bone resorption. **Endocrinology** 1997;138(5):2148-2162.

TAKAHASHI I, NISHIMURA M, ONODERA K, BAE JW, MITANI H, OKAZAKI M, SASANO Y, MITANI H. Expression of MMP-8 and MMP-13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. **J Dent Res** 2003;82(8):646-51.

THYLIN MR, MCCONNELL JC, SCHMID MJ, RECKLING RR, OJHA J, BHATTACHARYYA I, MARX DB, REINHARDT RA. Effects of simvastatin gels on murine calvarial bone. **J Periodontol** 2002;73(10):1141-8.

UNEMORI EN, BECK LS, LEE WP, XU Y, SIEGEL M, KELLER G, LIGGITT HD, BAUER EA, AMENTO EP. Human relaxin decreases collagen accumulation in vivo in two rodent models of fibrosis. **J Invest Dermatol** 1993;101(3):280-5.

VAN DER PLUJIM G, BINDERUP L, BRAMM E, VAN DER WEE-PALS L, DE GROOT H, BINDERUP E, LÖWIK C, PAPAPOULOS S. Disodium 1-hydroxy-3-(1-pyrrolidiny)-propylidene-1,1-bisphosphonate (EB-1053) is a potent inhibitor of bone resorption in vitro and in vivo. **J Bone Miner Res** 1992;7(8):981-986.

WADDINGTON R J, EMBERY G. Proteoglycans and orthodontic tooth movement. **J Orthod** 2001;28(4):281-290.

WISE GE, LUMPKIN SJ, HUANG H, ZHANG Q. Osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor in tooth eruption. **J Dent Res** 2000;79(12):1937-42.

WONG B, LUMMA WC, SMITH AM, SISKO JT, WRIGHT SD, CAI TQ. Statins suppress THP-1 cell migration and secretion of matrix metalloproteinase 9 by inhibiting geranylgeranylation. **J Leukoc Biol** 2001;69(6):959-962.

YABUMOTO T, MIYAZAWA K, TABUCHI M, SHOJI S, TANAKA M, KADOTA M, YOSHIZAKO M, KAWATANI M, OSADA H, MAEDA H, GOTO S. Stabilization of tooth movement by administration of reveromycin A to osteoprotegerin-deficient knockout mice. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**. 2013;44(3):368-80.

ZHAO N, LIN J, KANZAKI H, NI J, CHEN Z, LIANG W, LIU Y. Local osteoprotegerin gene transfer inhibits relapse of orthodontic tooth movement. **Am J Orthod Dentofacial Orthop** 2012;141(1):30-40.

ZHOU X, ZHANG P, ZHANG C, AN B, ZHU Z. Tetracyclines inhibit rat osteoclast formation and activity in vitro and affect bone turnover in young rats in vivo. **Calcif Tissue Int** 2010;86(2):163-71.

APÉNDICE 1

Apêndice1: Dados das mensurações do grupo controle (contr), sinvastatina (sinv) e tetraciclina modificada (tetra), das imagens reconstruídas (img recon) e microtomografia TC (micro-TC), estão representadas as médias, desvio padrão (d.p) e o total das movimentações dentárias induzidas.

	Tomo 1		Tomo2		Tomo 3	
	img recon	microt CT	Img recon	microt CT	img recon	microt CT
contr1	0,155	0,154534	0,219	0,186083	0	0,097735
contr 2	0	0,109272	0,21	0,176196	0,147	0,195472
contr 3	0,142	0,142473	0,416	0,367323	0	0,048867
contr 4	0	0,109272	0,125	0,124589	0	0,097735
contr5	0,109	0,154534	0,221	0,124589	0,147	0,146604
contr 6	0,109	0,109272	0,125	0,124589	0	0,097735
contr 7	0	0,109272	0,125	0,097735	0	0,048867
contr 8	0,109	0,077266	0,346	0,269882	0	0,097735
contr 9	0,155	0,154534	0,201	0,172774	0,125	0,124589
contr10	0,186	0,154534	não	0,201488	0,125	0,124589
total	0,799	1,274963	1,988	1,845248	0,419	1,079928
média	0,086556	0,127496	0,22088	0,184524	0,046556	0,107992
d.p	0,063622	0,026457	0,095349	0,077141	0,066111	0,041360
	img recon	microt CT	Img recon	microt CT	img recon	microt CT
sinv 2	0	0,109272	0,125	0	morreu	morreu
sinv 3	0,109	0,154534	0,367	0,24917	0,319	0,297252
sinv 4	0	0,210189	1,23	0,97735	0,195	0,293207
sinv 5	0,176	0,176196	0,451	0,27859	0,125	0,012458
sinv 6	0,109	0,109272	0,147	0,097735	0	0,097735
sinv 7	0,142	0,142473	0,394	0	morreu	morreu
sinv 8	0,142	0,142473	0,125	0,172774	0,201	0,124589
sinv 10	0,109	0,154534	0,125	0,201488	0	0,097735
sinv 11	0,186	0,186083	0,125	0,077266	0	0,097735
sinv 12	0,263	0,218544	0,173	0,077266	0,147	0,146604
sinv 13	0	0,154534	0	0,109272	0,147	0,146604
sinv 14	0	0,142473	0,48	0,32599	0,201	0,172774
sinv 2a	0,201	0,201488	0,796	0,795512	0,416	0,416095
sinv 3a	0,109	0,077266	0,125	0,201488	0	0,097735
sinv 4a	0	0	0,186	0,186083	0,125	0,012458
sinv 5a	0	0,142473	0	0,77266	0	0,097735
sinv 6a	0,232	0,186083	0,221	0,172774	0,147	0,014660
total	1,636	2,507887	4,365	4,509351	1,751	2,112919
média	0,136333	0,161153	0,36375	0,322097	0,145917	0,150923
d.p	0,083560	0,051765	0,31856	0,281080	0	0,110441

	img recon	microt CT	img recon	microt CT	img recon	microt CT
Tetra 1a	0,109	0,186083	0,788	0,651979	0,221	0,221259
Tetra2	0,232	0,231801	0,27	0,297252	0,221	0,269882
Tetra2a	0,186	0,218544	0	0,527457	0,221	0,221259
Tetra 3	0,109	0,109272	0,374	0,32599	0,391	0,367323
Tetra 3a	0	0,077266	0	0,154534	0	0,097735
Tetra 4	0,109	0,154534	0,147	0,172774	0	0,097735
Tetra 5	0,186	0,186083	0,443	0,393986	0,27	0,222125
Tetra 6	0	0	0,125	0,048867	0,125	0,097735
Tetra 7	0	0,109272	0,498	0,469996	0	0,097735
Tetra 8	0	0,124589	0,173	0,249178	0	0,097735
Tetra 9	0	0,077266	0,221	0,195472	0	0,048867
Tetra 10	0	0,154534	0,328	0,218544	0,221	0,172774
Tetra 11	0,109	0,154534	0,279	0,373768	0,346	0,221259
Tetra 12	0,201	0,201488	0,824	0,853441	0,195	0,146604
Tetra 14	0,201	0,231801	não	não	0,244	0,249178
Tetra 15	0,232	0,231801	0,804	0,803725	0,465	0,439811
total	1,287	2,217067	5,274	5,736963	2,455	2,819839
média	0,099	0,147804	0,405692	0,382464	0,188846	0,187989
d.p	0,088906	0,064703	0,242610	0,230661	0,151474	0,103774

Apêndice 2.1: Dados da densitometria óssea, representados pela densidade mineral óssea da raiz distal e a unidade Hounsfield, durante a primeira, segunda e terceira tomada microtomográfica.

	Tomo 1		Tomo 2		Tomo 3	
	Densidade	Hounsfield	Densidade	Hounsfield	Densidade	Hounsfield
contr 1	0,197	2.250	0,254	3.051	0,345	2.917
contr 2	0,249	2.976	0,266	3.214	0,263	3.178
contr 3	0,228	2.679	0,260	3.128	0,254	3.045
contr 4	0,248	2.970	0,269	3.265	0,264	3.196
contr 5	0,231	2.734	0,246	2.941	0,251	3.001
contr 6	0,268	3.253	0,253	3.035	0,260	3.134
contr 7	0,254	3.052	0,266	3.215	0,267	3.233
contr 8	0,273	3.318	0,255	3.059	0,259	3.114
contr 9	0,269	3.259	0,252	3.021	0,261	3.153
média	0,246	2.943	0,257	3.103	0,258	3.108
D. P	0,024	343,38	0,007	108,26	0,006	101,88

	Tomo 1		Tomo 2		Tomo 3	
	Densidade	Hounsfield	Densidade	Hounsfield	Densidade	Hounsfield
sinv 3	0,267	3.227	0,313	3.880	0,261	3.154
sinv 4	0,252	3.027	0,279	3.401	0,256	3.075
sinv 5	0,276	3.352	0,258	3.100	0,260	3.137
sinv 6	0,249	2.977	0,238	2.826	0,297	3.654
sinv 8	0,259	3.122	0,285	3.481	0,236	2.796
sinv 10	0,252	3.024	0,317	3.940	0,253	3.036
sinv 11	0,267	3.232	0,277	3.378	0,238	2.823
sinv 12	0,253	3.041	0,292	3.582	0,245	2.930
sinv 14	0,311	3.845	0,283	3.452	0,244	2.907
sinv 15	0,308	3.810	0,279	3.394	0,252	3.028
média	0,269	3.266	0,282	3.443	0,254	3.054
D. P	0,022	318,35	0,023	327,62	0,017	243,80

	Tomo 1		Tomo 2		Tomo 3	
	Densidade	Hounsfield	Densidade	Hounsfield	Densidade	Hounsfield
Tetra 2	0,266	3.220	0,310	3.840	0,257	3.090
Tetra 3	0,274	3.324	0,321	3.994	0,253	3.030
Tetra 4	0,240	2.855	0,306	3.779	0,238	2.830
Tetra 5	0,237	2.815	0,307	3.790	0,240	2.849
Tetra 6	0,239	2.844	0,311	3.852	0,256	3.075
Tetra 7	0,239	2.837	0,306	3.782	0,243	2.898
Tetra 8	0,244	2.908	0,320	3.978	0,241	2.868
Tetra 9	0,241	2.861	0,302	3.727	0,234	2.766
Tetra 10	0,226	2.654	0,317	3.938	0,242	2.881
Tetra 11	0,244	2.913	0,310	3.840	0,249	2.980
média	0,245	2.923	0,311	3.852	0,245	2.927
D. P	0,014	198,84	0,006	90,276	0,007	110,36

Apêndice 2.2: Dados da densitometria óssea, representados pela densidade mineral óssea mesial e a unidade Hounsfield, durante a primeira, segunda e terceira tomada microtomográfica.

	Tomo 1		Tomo 2		Tomo 3	
	Densidade	Hounsfield	Densidade	Hounsfield	Densidade	Hounsfield
contr 1	0,276	3.236	0,249	2.973	0,169	1.852
contr 2	0,273	3.319	0,224	2.630	0,225	2.646
contr 3	0,222	2.594	0,149	1.569	0,171	1.888
contr 4	0,237	2.817	0,168	1.839	0,143	1.498
contr 5	0,175	1.941	0,219	1.858	0,196	2.236
contr 6	0,274	3.331	0,230	2.707	0,218	2.539
contr 7	0,215	2.496	0,174	1.933	0,203	2.338
contr 8	0,254	3.044	0,228	2.691	0,230	2.718
contr 9	0,250	2.994	0,168	1.838	0,219	2.557
média	0,241	2.864	0,201	2.226	0,197	2.253
D. P	0,033	457,76	0,035	514,98	0,030	420,74

	Tomo 1		Tomo 2		Tomo 3	
	Densidade	Hounsfield	Densidade	Hounsfield	Densidade	Hounsfield
sinv 3	0,254	3.052	0,223	2.613	0,223	2.607
sinv 4	0,24	2.849	0,138	1.421	0,224	2.630
sinv 5	0,234	2.774	0,201	2.312	0,217	2.526
sinv 6	0,244	2.915	0,15	1.596	0,174	1.923
sinv 8	0,26	3.130	0,264	3.195	0,181	2.028
sinv 10	0,214	2.494	0,261	3.154	0,213	2.479
sinv 11	0,196	2.232	0,208	2.400	0,24	2.854
sinv 12	0,214	2.495	0,201	2.312	0,204	2.352
sinv 14	0,256	3.082	0,239	2.832	0,215	2.502
sinv 15	0,168	1.838	0,136	1.393	0,107	991
sinv 3a	0,17	1.865	0,183	2.053	0,167	1.823
média	0,222	2.612	0,200	2.298	0,196	2.171
D. P	0,031	445,90	0,048	684,22	0,037	529,58

	Tomo 1		Tomo 2		Tomo 3	
	Densidade	Hounsfield	Densidade	Hounsfield	Densidade	Hounsfield
Tetra 2	0,244	2.907	0,119	1.160	0,163	1.770
Tetra 3	0,28	3.412	0,202	2.313	0,186	2.098
Tetra 4	0,257	3.095	0,197	2.254	0,153	1.627
Tetra 5	0,235	2.788	0,176	1.950	0,163	1.767
Tetra 6	0,246	2.936	0,148	1.561	0,192	2.182
Tetra 7	0,253	3.031	0,133	1.348	0,161	1.743
Tetra 8	0,241	2.865	0,149	1.579	0,169	1.850
Tetra 9	0,264	3.186	0,173	1.917	0,18	2.010
Tetra 10	0,259	3.118	0,189	2.141	0,175	1.939
Tetra 11	0,282	1.010	0,158	1.708	0,169	1.856
Tetra 12	0,271	3.290	0,218	2.539	0,196	2.229

média	0,257	2.793	0,218	2.539	0,173	1.915
D. P	0,014	869,88	0,029	410,68	0,013	184,93

ANIMAIS EXPERIMENTAIS

A instalação da primeira mola realizou-se com um animal experimental morto (Figura 25), devido às dificuldades inerentes do procedimento: pouco espaço para inserção do fio de amarrilho, que de início foi o de 0.20 mm, (o menor diâmetro do mercado) visualização deficitária, e procedimento demorado (cerca de 5 horas para a realização do procedimento no primeiro espécime).



Figura 25: Animal experimental previamente morto utilizado para treinamento quanto as instalações da molas.

Contatou-se a necessidade de um dispositivo de abertura bucal, onde foi providenciada a fabricação de uma mesa operatória (Figura 2), além de um menor fio de amarrilho para a inserção interproximal nos molares murinos, que foi fabricado pela dental Morelli, diminuindo o risco de injúria aos tecidos moles jugais e periodontais.

Além disso, foi utilizada uma mola pré-fabricada de níquel-titânio de sete milímetros de comprimento (referência 35.20.064- gentilmente cedido pela dental Morelli), que apesar de ser a de menor comprimento do mercado, ocupava muito espaço na região compreendida entre o incisivo murino e o primeiro molar, e sua ativação para se ajustar a 75cN aferido pelo dinamômetro, era de apenas 0,5 a 1 mm, podendo impor erros de aplicação da força durante a instalação da mesma.

TESTE DAS MOLAS

Após o primeiro animal experimental piloto foi instalado dois tipos de mola, (para validar a que melhor oferecesse segurança e praticidade), para a realização da pesquisa, que não compromettesse os resultados, e não adicionasse um viés metodológico ao experimento.

Apesar das molas pré-fabricadas de níquel titânio (NiTi) (Figura 26) apresentar praticidade e melhor movimentação dentária, devido as suas propriedades físicas superiores às molas de aço (ANGOLKAR *et al*, 1992) sua dificuldade de padronização quanto às ativações (0,5 a 1 mm) (MANGAZINI *et al*, 2010), e grande espaço ocupado na região bucal dos murinos, foi levado em consideração à utilização das molas de aço, como uma alternativa viável, pois as mesmas apresentaram uma maior ativação (cerca de 2 mm) para 75cN, facilitando a sua padronização em relação ao número dos animais, e seu menor tamanho físico quanto às distâncias envolvidas. Além disso, as molas de NiTi têm suas propriedades mecânicas modificadas por fatores ambientais como a temperatura (NATTRAS *et al*, 1998).

A desvantagem das molas de aço residia na sua fabricação artesanal, e desativação rápida comparada às molas de níquel titânio (ANGOLKAR *et al*, 1992).

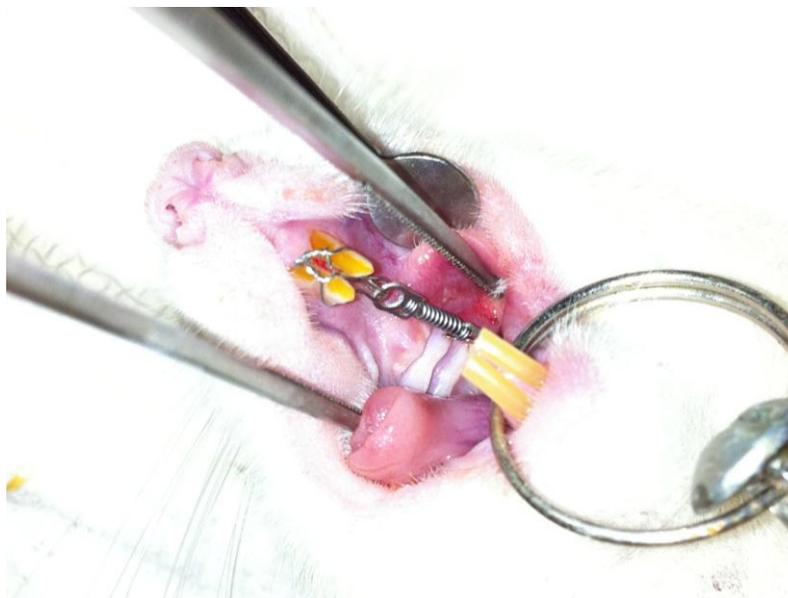
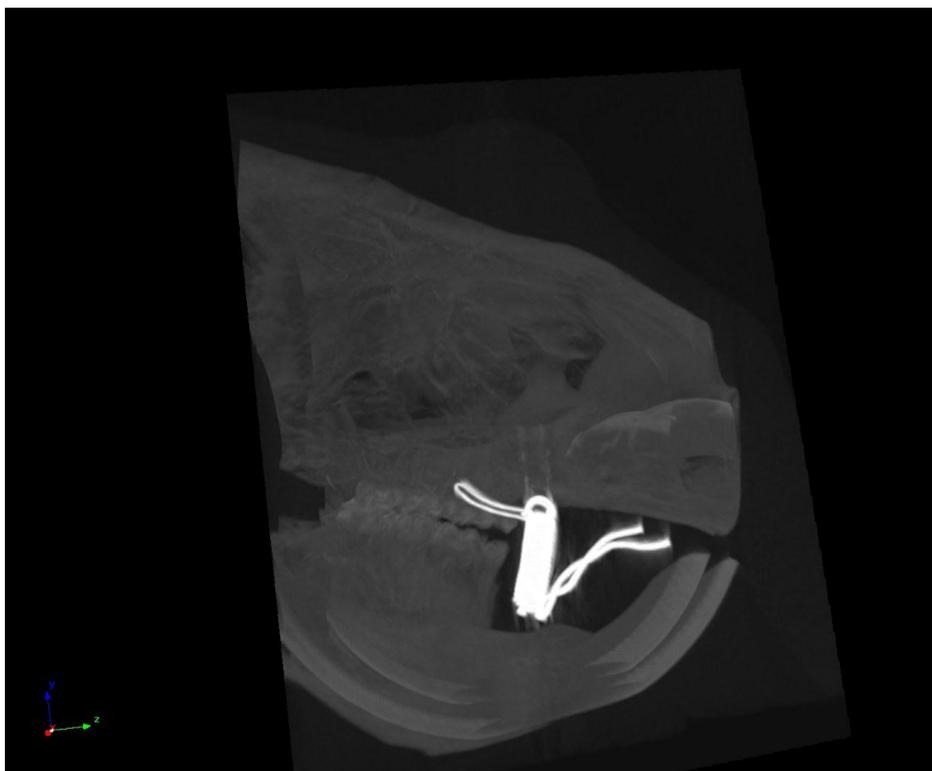


Figura 26: Teste das molas de níquel-titânio

IMAGENS DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os primeiros cinco animais experimentais pilotos apresentaram falhas na retenção dos dispositivos de movimentação dentária (durante o período observacional de três semanas), onde foi constatada a urgência de reforço dos fios de amarrilho, principalmente na região anterior dos incisivos murinos, além da necessidade da diminuição do comprimento dos dentes antagonistas. Isto foi definido após ser observado em um dos animais experimentais piloto, que somente a região posterior da mola (de aço) apresentava-se retida e presente nas imagens microtomográficas do mesmo (Figura 27). Após a mudança na metodologia da fixação das molas, foi realizado um segundo piloto (05 animais) por um período observacional de sete dias, onde se constatou o sucesso na retenção dos dispositivos de movimentação dentária, e decidiu-se pelo início da pesquisa propriamente dita.



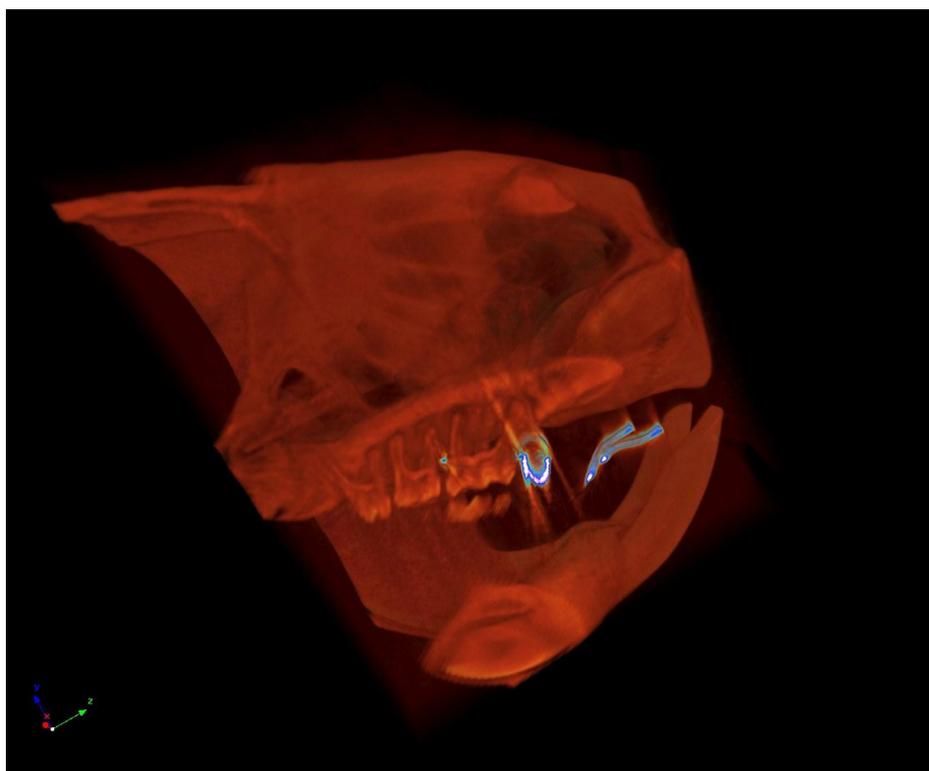


Figura 27: Falha na retenção das molas: Imagens microtomográficas de um animal com uma mola retida somente na região posterior.

PERDAS DE ANIMAIS

No início do experimento havia 50 animais, que foram distribuídos em um grupo controle com 15 animais e dois grupos experimentais com 15 animais cada, além de 5 animais reserva para alguma eventualidade. Porém, durante a instalação das molas, dois animais vieram a óbito, um durante a anestesia, e outro por aspiração de líquidos. Além disso, dois animais vieram a falecer durante os procedimentos microtomográficos, também durante a anestesia. Cinco animais perderam as molas durante o experimento, e um animal desapareceu do biotério, constatado durante a realização da segunda tomada microtomográfica, e foi recuperado após alguns dias, perto da terceira microtomografia. Portanto, permaneceram 40 animais que foram utilizados para a realização do experimento..

ANEXO 1 - CARTA APROVAÇÃO PROJETO- CEUA

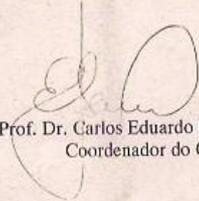
Faculdade de Medicina
Universidade de Brasília
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FM



Brasília, 27 de fevereiro de 2012

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “O efeito das tetraciclinas modificadas na recidiva da movimentação dentária no ligamento periodontal de ratos”, UnBDoc 7087/2012, sob responsabilidade do Rivadávio Fernandes Batista de Amorim, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.



Prof. Dr. Carlos Eduardo Gaio V. dos Santos
Coordenador do CEUA-FM

Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte Prédio FM/FS CEP: 70.910-900



**The effect of simvastatin on relapse of tooth movement and bone mineral density in rats
measured by a new method using microtomography**

Giovanni Modesto Vieira^I, Sacha Braun Chaves^{II}, Vânia Maria Moraes Ferreira^{III}, Karina Maria Salvatore de Freitas^{IV}, Rivadávio Fernandes Batista Amorim^V.

^IFellow PhD degree, Postgraduate Program in Medical Sciences, Department of Pathology, Federal University of Brasília (UnB), Brasília-DF, Brazil. Intellectual and scientific content of the study; technical and surgical procedures; acquisition, analysis and interpretation of data; manuscript writing

^{II}PhD, Adjunct Professor Institute of Biological Sciences, Department of Genetics and Morphology, Federal University of Brasília (UnB), Brasília-DF, Brazil. Technical and surgical procedures, acquisition, analysis and interpretation of data.

^{III}PhD, Adjunct Professor of Program in Medical Sciences and Behavioral Neuroscience, Federal University of Brasília (UnB), Brasília-DF, Brazil. Technical and surgical procedures, acquisition.

^{IV}PhD, Professor of the Program in Orthodontics, University of Uningá, Bauru-SP, Brazil. Analysis and interpretation of data, critical revision.

^VPhD, Adjunct Professor of Pathology, Coordinator of the Postgraduate Program in Medical Sciences, Federal University of Brasília (UnB), Brasília-DF, Brazil. Conception, design, intellectual and scientific content of the study; analysis and interpretation of data; critical revision.

Abstract:

Purpose: This study aimed to evaluate the effect of simvastatin on relapse of tooth movement in rats using microtomography (micro CT), as well as the correlation of bone density with the orthodontic relapse. **Methods:** Twenty-five adult male Wistar rats, divided into two groups, had stainless steel springs installed on left maxillary first molar. The molars were moved for 18 days, and after removing the springs, were applied by oral gavage, 5mg/kg of simvastatin in the experimental group for 20 days. Tooth relapse was assessed with a micro CT scanner, and the images chosen through the Data Viewer software 1.5.0.0 had their measurement guides made and checked by the software Image ProR plus 5.1, and compared by Mann-Whitney test. After rats were sacrificed, bone mineral density was evaluated by micro CT through the software CT Analyzer 1.13 and compared by independent T-test, as well as by Spearman correlation test. **Results:** Relapse and bone mineral density (BMD) was lower in the experimental group than in the control group, however without a statistically significant difference. **Conclusion:** Simvastatin did not inhibit the relapse of tooth movement in rats, and there was no correlation between bone density and orthodontic relapse.

Key-words: Recurrence, Simvastatin, X-ray microtomography, Densitometry

Introduction:

All orthodontic movement requires a retention phase, which aims to stabilize the tooth elements in its new position, allowing the periodontal tissues to remodel and settle the space balance newly established¹.

However, this balance not always occurs, and the exacerbated remodeling of the periodontium causes the relapse, i.e., the return of the original malocclusion, or dental crowding, because the occlusal instability after orthodontic treatment is common in almost all patients².

The etiology of relapse is multifactorial, varying from muscle disorders and harmful oral habits, changes in dental arch form, unfavorable growth pattern, to the stretch of the transeptal fibers³, and also has its origin due to the nature of immature and slightly mineralized bone tissue, which surrounds the tooth elements that were moved⁴.

Recently, it was found that most of the relapse occur within the first hours after the removal of orthodontic forces⁵ being crucial the process of alveolar bone remodeling in tooth movement relapse⁶ and that fixed retainers are not always effective to prevent tooth relapse⁷.

Some authors proposed the control of relapse through pharmaceuticals, like the bisphosphonates⁸, (but its potential risks, such as osteonecrosis, not enable it for clinical use⁹), osteoprotegerin¹⁰, relaxin¹¹ (hormones that can have another clinical effect).

The simvastatin is a drug related to the anabolic phase⁶, increasing the bone density^{12, 13}, and it was reported that simvastatin promotes osteoblasts activity and inhibits the osteoclastic activity¹⁴.

This work aimed to test the inhibition of the relapse of tooth movement by simvastatin in rats using a new micro CT methodology, with better accuracy than the current methods, as well as to correlate these findings with areas of tissue remodeling by bone densitometry analysis. It was hypothesized that the simvastatin inhibits the relapse of tooth movement in rats, through inhibition of bone resorption (and the increase in bone formation) with increase in bone mineral density, and that a correlation would be found between bone mineral density and relapse.

Material and methods:

Sample:

The sample comprised 25 adult male Wistar rats (*Rattus Norvegicus albinus*), with 4 months of age (mean of 133 days), weighing on average 354 ± 33 grams. They were kept in standardized conditions with water and feed *ad libitum*, ambient temperature and light-dark cycle of 12 hours (06:00-18:00) and obeying the criteria according to the norms of the Ethics Committee of Animal Use of the University of Brasília (UnB-70872012).

The animals were divided into two groups, 15 specimens in the experimental group and 10 specimens in the control group. The tooth elements to be studied were the maxillary first molars, with the left side representing the experimental side.

Group I: comprised 10 control animals that were sacrificed in the thirty-ninth day, with 18 days of induced tooth movement, with the application of 0.5% carboxymethyl cellulose (m/v) from the 19th day until the 38th day (20 days).

Group II: composed of 15 animals that were also sacrificed in the thirty-ninth day, with 18 days of tooth movement, with the application of a simvastatin solution with 0.5% carboxymethyl cellulose (m/v) from the 19th day until the 38th day (20 days).

Installation of the springs:

After anesthesia with ketamine (80mg/kg) and xylazine (10mg/kg), spiral springs were installed according to the model proposed by Heller and Nanda¹⁵, consisting of closed steel springs of 0.006" x 0.022" with the aid of 0.14mm steel ties and 9mm of length (Morelli-Sorocaba-Brazil), that was passed between the interproximal space from the first and second molars, holding one end of the spring between the left maxillary first molar and the lateral incisor of the same side.

The other end of the spring was attached to the maxillary incisor, through a hole between the two incisors performed with a spherical drill, to pass the 0.25mm ligature wire (Morelli-Sorocaba-Brazil). In the maxillary incisors, a mesial and distal groove were created, with an inverted conical drill (HM 1006 ½ FG Meissenger-Germany), for the fitting of two ligature steel wire of 0.25mm, which were fixed with composite resin (Filtek™ Z250 XT - 3M St. Paul, MN, USA). An initial force of 75cN was measured by a dynamometer (Correx haag-streit Ag, Koeniz, Switzerland). After the initial activation, the appliance has not received any reactivation during the experimental period. The movement occurred in mesial direction on the right maxillary first molar and was the object of study, despising the movement toward the palatal direction of the maxillary incisor on the same side (figure 1).

After installation of the springs, the animals were fed a ground ration to ease the effect of breakage of the devices. After 18 days of special diet, the animals had the springs removed, and had normal feeding, through conventional ration.

Stock solution of simvastatin:

Simvastatin was administered by oral gavage at a 5mg/kg dose, being the volumes administered during 20 days, the day after the end of tooth movement. The 0.5% carboxymethyl cellulose was used as vehicle, being administered 400µl of the drug or the placebo, via a probe for oral gavage coupled to a 1ml insulin syringe.

The stock solution of simvastatin was held according to Jabbari et al.¹⁶. It was dissolved 350mg of simvastatin, in 58.3ml of distilled water with the aid of a magnetic stirrer until complete homogenization and solubilization.

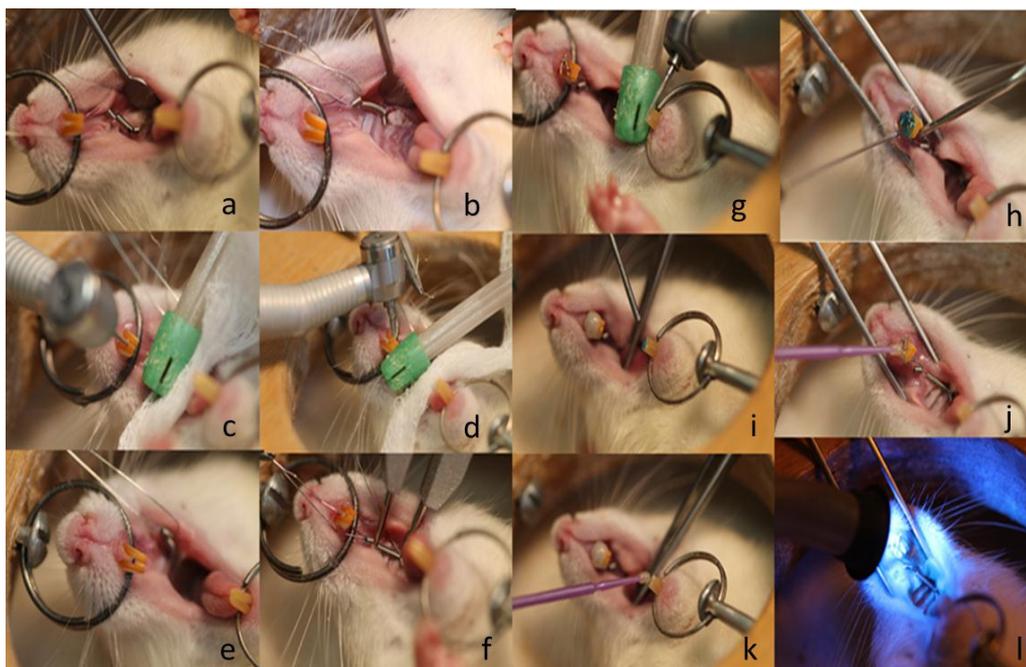


Figure 1: Spring installation procedure. a - The installation of the wire ligature in the space between the first and second molar of the murines. b - Wire ligature attached to the end of the spring. c – The making of the center hole. d – Channel confection mesial and distal upper incisors. g- The view of the channels made. f - Spring measurement with compass of drypoint for measure 6 mm in length, corresponding to 75 cN force. g- Antagonist teeth wear. h- Etching. i- Washing and drying. j - Primer application on the upper teeth. k Primer application on the lower teeth. l- Application of composite resin and curing.

Acquisition of images:

The acquisition of images was accomplished with the aid of a micro scanner Skyscan 1076 in vivo Bruker-micro CT, which generated micro CT radiographic images and subsequently were selected with the Data Viewer software version 1.5.0.0-Bruker-micro CT.

The following parameters were used for the generation of micro CT images, which took about 7 minutes for each specimen: voltage 100 Kv, 1mm Al filter, resolution of 35 μ m. It was taken 3 micro CT computed outlets: first micro CT, after the installation of the springs in the animals, which ranged from four to seven days, after the installation of the springs, second micro CT, after 18 days of tooth movement, third micro CT, after 20 days of prescription drugs.

Selection and quantification of micro CT images:

The quantification of the tooth movement was performed through micro CT, with the software Data Viewer version 1.5.0.0-Bruker-micro CT who selected the 75 images for subsequent manufacture of guides and measurement of the tooth movement, through the software Image Pro^R Plus 5.1-Media Cybernetics. The selection of 75 micro CT images was accomplished through the use of coordinates x, y, z, representing their respective spatial plans: vertical, horizontal and transversal, which envisioned the roots (distal) of the first molar and (mesial) of the second molar of the murines, in the sagittal plane, what better approach of the following parameters: sharpness of images along the entire

length of the roots, visualization of the three molars of murine in the same plane, and absence of artifact or overlap that precludes visualization of anatomical structures.

The guides of measurement were performed with the software Image Pro^R plus 5.1-Media Cybernetics, and consisted in a line representing the occlusal plane, which had as its origin and end: the mesiobuccal cusp tip of the left maxillary first molar and the distobuccal cusp tip of the left second molar. After tracing the occlusal plane, based on these dental elements, were drawn two perpendicular surfacing the most convex points of the distobuccal root of the left first molar and of the mesiobuccal root the left second molar, minimizing the measurement errors from the tipping and extrusion movements that occur on the first molar of the rat¹⁷ (figure 2).

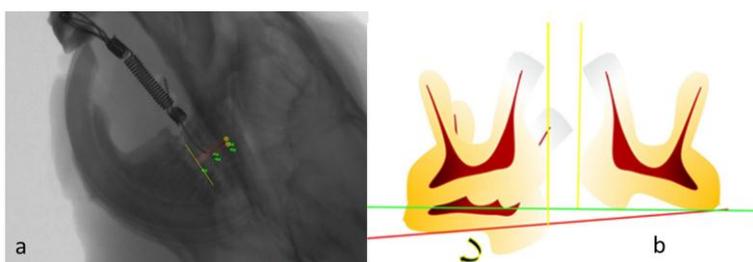


Figure 2: the micro CT radiographic Image chosen with measurement guides. b schematic figure of the measuring guides.

Dental movement can be calibrated between these two perpendiculars with the software Image Pro^R plus 5.1-Media Cybernetics (figure 3).

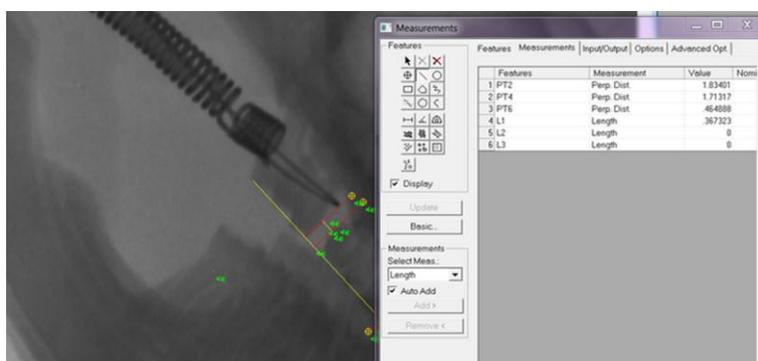


Figure 3: Measurement of tooth movement through micro CT x-rays.

Densitometry:

Bone mineral density (BMD) was performed with the CT Analyzer software 1.13 Bruker micro CT where regions of interest were established through the visualization of the mesial and distal root of the left maxillary first molars. To carry out this analysis, the 109mm distance between the complete disappearances of the root of a micro-CT image to another image, was the parameter used for the delimitation of the upper and lower limit, the region comprised by micro CT images.

The use of a circle of 60 x 60 pixels, which would include the root and its surrounding bone structure, was used in the entire micro CT images analyzed (figure 4).

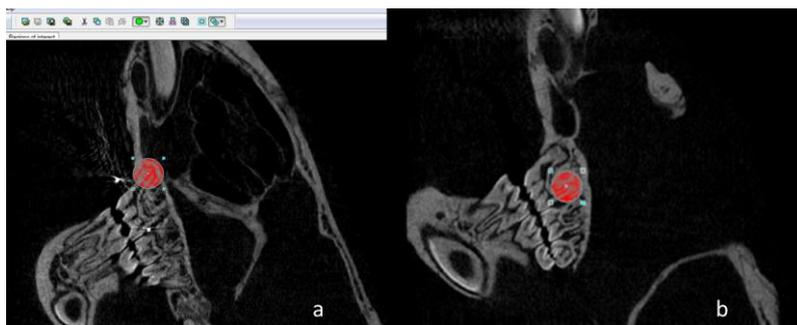


Figure 4: circle of 60 x 60 pixels including the mesial (a) and distal (b) region of the left maxillary first molar of a reconstructed micro CT image.

Euthanasia:

Euthanasia of animals was performed through a gas chamber in the vivarium of the institute of biological sciences at the University of Brasilia-UnB, through carbon monoxide gas for a period of 10 minutes, until the complete death of the animals.

Statistical analysis:

A two-tailed hypothesis test was conducted with a significance level of 5%, with the software Statistical Package for Social Sciences-SPSS-20.

Through a univariate analysis was conducted the Shapiro Wilk normality test, indicating that data did not follow the normal curve, requiring the use of nonparametric tests. The nonparametric Mann-Whitney test was used for evaluation of dental movement and relapse between the two groups. The weight of the animals and the bone densitometry comparison between the groups was assessed by independent T-test, because they followed the normal curve.

For the evaluation of intra-examiner error, were retraced and remeasured 75 guides with their respective measurements, 30 and 60 days after the completion of the initial measurements.

Results:

Analysis of tooth movement:

It was observed that the tooth elements of the murine gradually moved to a certain limit, after which (after the removal of springs) tended to return to its original position (relapse).

In the statistical analysis there was no statistical significance in the comparison between the two groups after the initial tooth movement (initial micro CT) and also no significant difference at the end of the 18th-day of movement (18d micro CT), as well as in the weight of the animals (table 1).

No statistically significant difference was found between the two groups examined, regarding the final micro CT (tables 2).

Analysis of bone densitometry:

a- Mesial root

Bone mineral density has tended to reduce as the tooth movement occurred, stabilizing in the control group with values in g/cm^3 lesser than the initial ones, after removal of the springs, during the period of relapse in the simvastatin group (figure 5 e 6), but no statistically significant difference was found between the two groups regarding bone density (table 2).

b- Distal root

Bone mineral density has tended to increase as the tooth movement occurred, stabilizing in the control group with values in g/cm^3 greater than the initial ones, after removal of the springs, during the period of relapse in the simvastatin group (figure 5 e 6), but no statistically significant difference was found between the two groups regarding bone density (table 2).

Bivariate correlation:

No significant correlation was found between relapse represented by the difference in final micro CT and bone mineral density of the mesial and distal root of the left maxillary first molar (table 3).

Table 1: Characteristics between the groups

Characteristics of the groups			
	Control (n=10)	Simvastatin (n=15)	p value
Demographics			
Gender M/F (%)	10/0 (100)	15/0 (100)	
Weight ^(a)	350 (320-381)	371 (356-385)	0.195*
InitialAssessment			
InitialDensity (mesial root) ^(b)	0.241 (0.149-0.276)	0.211 (0.107-0.264)	0.395*
InitialDensity (distal root) ^(c)	0.246 (0.197-0.273)	0.267 (0.248-0.311)	0.393*
InitialMicroCT ^(d)	0.125 (0.109-0.154)	0.154 (0.142-0.186)	1.000 [†]
^a grams	^{b, c} Density bone mineral: average (Confidence interval 95%)	^d Image micro CT median (percentis 25-75)	[†] independent samples t † Mann Whitney test

Table 2: Final bone mineral density and relapse evaluated by Micro-CT of the mesial and distal root of the left maxillary first molar

Groups					
		Control (n=10)		Simvastatin (n=15)	
<u>Independent test T</u>					
Mesial root	P-value	standart deviation	average	standart deviation	average
	0.455	0.022	-0.028	0.027	-0.012
Distal root	p-value	standart deviation	average	standart deviation	average
	0.724	0.148	0.0078	0.045	-0.0046
<u>Mann Whitney test</u>					
P-value	median	standart deviation	median	standart deviation	
1.000	0.0040	0.0025	0.0041	0.1145	

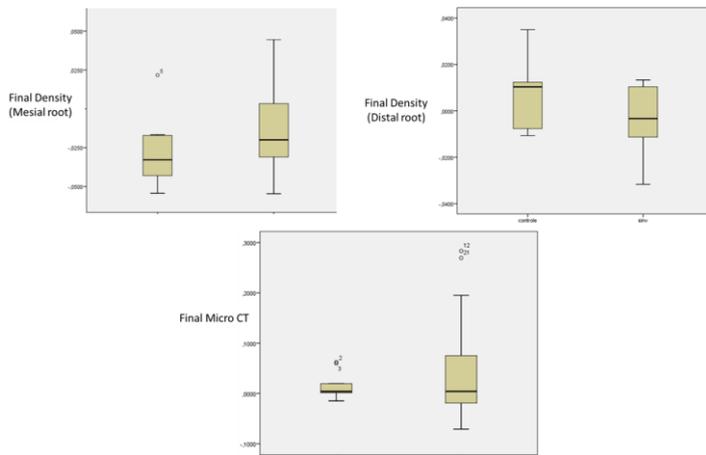


Figure 5: Box plot Chart: final micro CT and final densitometry

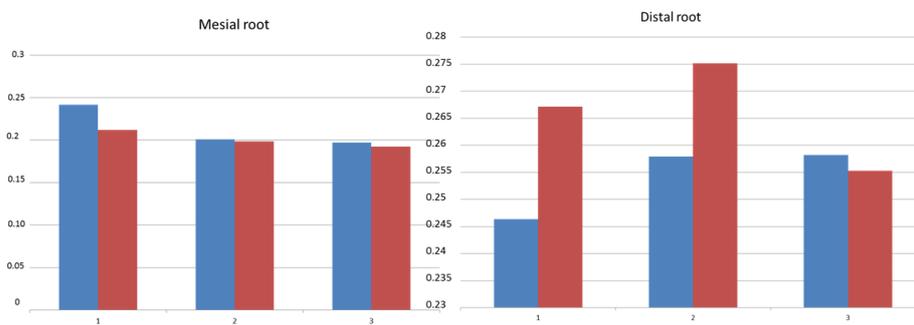


Figure 6: Bone Mineral Density (g/cm3) of control (blue) and simvastatin (red) during: beginning of movement 4 to 7 days (1), movement at 18 days (2) and beginning of application of simvastatin, and end of the movement (3) with 38 days.

Table 3: Correlation between final bone density and relapse (Micro-CT).

	Groups	
Spearman Correlation	Final Density bone	Fina Micro CT
Distalroot P-Value	0.404	0.404
Spearman correlation	Final Density bone	Final Micro CT
Mesialroot P-Value	0.281	0.281

Discussion

The drug simvastatin is a drug related to the treatment of hypercholesterolemia and hyperlipidemia¹⁸, acting as a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMG-Co-a), limiting the enzyme rate responsible for the cholesterol synthesis.

In the last decade, emphasis was given on the effect of the drug on bone tissue being observed: expression of bone morphogenetic protein (BMP-2), when their local administration in bone tissue¹⁹, in vitro bone inductive effect²⁰, stimulating mineralization and differentiation of mesenchymal cells into new cells responsible for bone neoformation²¹.

The application of simvastatin was performed avoiding high doses are out of normal prescription²², and 10mg/kg a day in rats is a high dose that would correspond in pharmacokinetic terms, to 70mg/kg a day in humans, and these high doses of simvastatin increase the risk of liver failure, kidney diseases, rhabdomyolysis and myalgia²³. So it was adopted the oral dose of 5mg/kg a day in rats, equivalent to 20 to 40 mg daily dose normally used in humans.

In the present study, simvastatin did not interfere on relapse of tooth movement, with no statistically significant values, contrary to others works^{6, 24}, what may be due to greater effectiveness of the intravenous administration used for their researches. However, the risk of crusts or scabs in surrounding skin, due to local daily drug injections²⁵, in a long period, facilitated the adoption of the mouth as the most suitable for a study during this time of observation.

Actually, there are works that attest that the simvastatin is not well absorbed, and less than 5% of the drug is in the bloodstream, after application by oral via¹⁴. However, it is well-argued that osteoblasts and osteoclasts may be well exposed to low concentrations orally¹⁴.

In addition, the assessment method used by other researches^{6, 24}, is more prone to failure, considering that the various stages of the transfer process, than a direct analysis on tomographic images in real scale. And photo editing programs do not have sufficient accuracy, because they are not especially manufactured for accurate measurements in appropriate scale, compared to the sophistication of image processing software, whose analysis tool provides advanced measurement of microscopic and radiographic images, without the need of using the macro. On the other hand, a digital caliper that using directly in the mouth of animals, between the incisors and the first molars²⁴, limits the accuracy and precision of the measurements, including the extrusion and tipping of the molars due to the induced tooth movement¹⁷, besides the continuous incisors eruption, typical to the rodent animals²⁶.

Despite the stimulus to mineralization and differentiation, responsible for bone neoformation¹⁷, there is no evidence of increased bone density around the mesial and distal root, proving bone neoformation¹⁷, after the removal of the orthodontic device and use of simvastatin by oral gavage, instead, there was a decrease in bone mineral density after the induced tooth movement and drug institution.

Simvastatin inhibits the subproducts of the mevalonate, specifically the isoprenoids farnesyl diphosphate and geranylgeranyl diphosphate that have ligating affinity for the terminal carbons of the small ligating proteins called GTP, forming the so-called prenylated cytosolic proteins.

An example of these prenylated proteins are the Rac and Rho, which are essential in the activation of cell polarization and motility, including macrophages and osteoclasts²⁷.

The bisphosphonates also inhibit prenylation, inhibiting osteoclastic function and bone resorption, and ponder that the simvastatin would have similar effect²⁸, but so would an increase in BMD after application of the drug, taking into account the effect of the drug on catabolic strand of the bone tissue.

However, another research²⁷ found that at low doses (1,0mg/kg to 5,0mg/kg), simvastatin exhibits effect of reduction of BMD in rats, with decrease in bone formation and increase in bone reabsorption²⁷.

Actually, the results of the present study confirm the findings of Maritz et al.²⁷ and Park¹⁴, that found decrease in bone deposition and increase in bone resorption with decrease of BMD, with the use of low doses of simvastatin^{27, 14} (1,0mg/kg to 5mg/kg).

According to these authors, only with high doses of simvastatin (20mg/kg) there will be an increase in bone formation, with any change in the rate of bone mineral density^{27, 14}. Osteoblasts would be preferentially stimulated, with the maintenance or increase in bone mineral density²⁷.

And this discrepancy in the response of bone remodeling to the doses of simvastatin, could be explained by the difference in sensitivity between the cells responsible for the formation and destruction of the bone tissue, with greater sensitivity by osteoclasts to the simvastatin²⁷, which would present a different effect of prenylation, found by the study of the drug *in vitro*²⁸.

This also occurs with bisphosphonates, which also inhibit the prenylation, but whose effects on osteoclastic cells are dependent on the drug dosage. The EB-1053 inhibits the osteoclastic function in normal doses, but in low dosage increases osteoclastic function²⁹. This could explain the decrease in bone mineral density to simvastatin in the specimens studied.

Interesting, that as the reduction in bone mineral density was not significant between the groups, the rate of resorption also did not present accelerated, with increase in catabolic turnover, to the point of increase relapse of induced tooth movement in the simvastatin group, statistically proven by analysis of micro-CT, and by the lack of correlation between the relapse and bone density.

Theoretically, there will only be inhibition of relapse of induced tooth movement, with a decrease in the rate of bone mineral resorption, resulting from inhibition of osteoclasts and osteoblasts stimulation, resulting in an increase of BMD and bone formation, which in fact did not occur in the present research.

Conclusion:

Simvastatin did not inhibit relapse of induced tooth movement, and there has been a decrease in BMD in the mesial and distal root of the left maxillary first molars, after the drug administration, which was not statistically significant between the two groups.

There was no correlation between the bone density of the mesial and distal root of the left maxillary first molar that was moved and its relapse.

References:

- 1- Littlewood S.J, Millett D.T, Doubleday B, Bearn D.R., Worthington H.V. Orthodontic retention: A systematic review. J Orthod. 2006;33(3):205–12. doi: 10.1179/14653120722770
- 2- Riedel RA, Brandt S. Dr. Richard A. Riedel on retention and relapse. J Clin Orthod. 1976;10(6):454-72. PMID: 1074893
- 3- Littlewood SJ, Russell JS, Spencer RJ. Why do Orthodontic Cases Relapse? Orthod Update. 2009;2:43-9.

- 4- Hsu J.T, Chang H.W, Huang H.J, Yu J.H, Yu F, Tu M.G. Bone density change around teeth during orthodontic treatment. *Clin oral Invest.* 2011;15(4):511-19. doi: 10.1007/s00784-010-0410-1
- 5- Franzen JT, Brudvik P, Radunovic VV. Periodontal tissue reaction during orthodontic relapse in rat molars. *Eur J Orthod.* 2011;35(2):152-9. doi: 10.1093/ejo/cjr127.
- 6- Han G, Chen Y, Hou J, Liu C, Chen C, Zhuang J, Meng W. Effects of simvastatin on relapse and remodeling of periodontal tissues after tooth movement in rats. *Am J of Orthod Dentofacial Orthop.* 2010;138(5):550-7. PMID: 21055594
- 7- Littlewood SJ, Millett DT, Doubleday B, Bearn DR, Worthington HV. Retention procedures for stabilizing tooth position after treatment with orthodontic braces. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004; (1):CD002283. doi: 10.1002/14651858
- 8- Adachi H, Igarashi K, Mitani H, Shinoda H. Effects of topical administration of a bisphosphonate (risedronate) on orthodontic tooth movements in rats. *J Dent Res.* 1994;73(8):1478-86. doi: 10.1177/00220345940730081301
- 9- Zahrosowski JJ. Bisphosphonate treatment: An orthodontic concern calling for a proactive approach. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131(3):311–20. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajodo.2006.09.035>
- 10- Hudson JB, Hatch N, Hayami T, Shin JM, Stolina M, Kostenuik PJ, Kapila S. Local delivery of recombinant osteoprotegerin enhances postorthodontic tooth stability. *Calcif Tissue Int.* 2012;90(4):330-42. doi: 10.1007/s00223-012-9579-4.
- 11- Hirate Y, Yamaguchi M, Kasai K. Effects of Relaxin on Relapse and Periodontal Tissue Remodeling after Experimental Tooth Movement in Rats. *Connective Tissue Research.* 2012;53(3):207-19. doi: 10.3109/03008207.2011.628060
- 12- Singh K. S, Dodward V, Dhariwal G. Simvastatin and periodontal regeneration. *J Pharm Biomed Sci.* 2012;21(25):1-4.
- 13- Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Effects of statins on bone mineral density: A meta-analysis of clinical studies. *Bone.* 2007;40(6):1581–7. PMID: 17409043
- 14- Park B. J. The use of simvastatin in bone regeneration. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009;14(9):485-88. PMID: 19415061

-
- 15- Heller IJ, Nanda R. Effect of alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod.* 1979;75(3):239-58. PMID: 285607
 - 16- Jabbari M, Zohreh Rostami J, Jenabl A, Zahedi-Shoolami L, Mooraki A. Simvastatin Ameliorates Gentamicin-Induced Renal Injury in Rats. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2011;22(6):1181-6. doi: 10.3109/0886022X.2011.560987.
 - 17- Gonzalesa C, Hotokezakab H, Araic Y, Ninomiyad T, Tominagaa J, Janga I, Hotokezaka Y, Tanaka M, Yoshida N. An In Vivo 3D Micro-CT Evaluation of Tooth Movement after the Application of Different Force Magnitudes in Rat Molar. *Angle Orthod.* 2009;79(4):703-14. doi: 10.2319/071308-366.1
 - 18- Hassan MH, Elgayar MA, Ibrahim MT, Al-Gayyar HM. Anti-inflammatory Effect of Simvastatin-Aspirin Combination. *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* 2011;3(2):89-96.
 - 19- Mundy G, Garret R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science.* 1999;289(5446): 1946-9. PMID: 10583956
 - 20- Maeda T, Matsunuma A, Kurahashi I, Yanagawa T, Yoshida H, Horiuchi N. Induction of osteoclasts differentiation indices by statin in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem.* 2004;92(3):458-71. PMID: 15156558
 - 21- Houshmand B, Hassanizade R, Eslami B, Amouuei S, Dashti G, Morad G, Khojasteh A. Simvastatin and Lovastatin induce ectopic bone formation in rat subcutaneous tissue. *Journal of Periodontology & Implant Dentistry.* 2010; 2(1):12-6. doi:10.5681/jpid.2010.002
 - 22- Singh KS, Dodward V, Dhariwal G. Simvastatin and periodontal regeneration. *J Pharm Biomed Sci.* 2012;21(25):1-4.
 - 23- Jadhav SB, Jain GK. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. *J Pharm Pharmacol.* 2006;58(1):3-18. Doi: 10.1211/jpp.58.1.0002.
 - 24- Esfahani N.E.A, Sadeghian S, Razavi S.M, Minaiyan M, Afsari E. The Effects of Simvastatin on Bone Remodeling, Tooth Movement and Root Resorption in Orthodontic Treatments. *Biomed. Pharmacol. J.* 2013;6(2):271-8. doi: <http://dx.doi.org/10.13005/bpj/414>.
 - 25- Thylin MR, McConnell JC, Schmid MJ, Reckling RR, Ojha J, Bhattacharyya I, Marx DB, Reinhardt RA. Effects of simvastatin gels on murine calvarial bone. *J Periodontol.* 2002;73(10):1141-8. PMID: 12416771

- 26- Burn-Murdoch R.A. The length and eruption rates of incisors teeth in rats after one or more them had been unimpeded. *Eur J Orthod.* 1999;21(1):49-56. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/ejo/21.1.49> 49-56
- 27- Maritz F.J, Conradie M.M, Hulley P.A, Gopal R, Hough S. Effect of Statins on Bone Mineral Density and Bone Histomorphometry in Rodents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(10):1636-41. PMID: 11597938
- 28- Sugiyama M, Kodama T, Konishi K, Abe K, Asami S, Oikawa S. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;271(3):688–92. PMID: 10814523
- 29- van der Pluijm G, Binderup L, Bramm E, van der Wee-Pals L, De Groot H, Binderup E, Löwik C, Papapoulos S. Disodium 1-hydroxy-3-(1-pyrrolidinyl)-propylidene-1,1-bisphosphonate (EB-1053) is a potent inhibitor of bone resorption in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res.* 1992;7(8):981–6. PMID: 1442212

Correspondence:

Rivadávio Fernandes Batista Amorim

Departamento de Patologia

Universidade Federal de Brasília

Campus Darcy Ribeiro – Faculdade de Medicina, Asa Norte,

Cep: 70910-900 - Brasília, DF – Brasil,

Tel: +55 (61) 33072560

Fax: +55 (61) 3107.1907

Email: rivadavioamorim@hotmail.com

Conflict of interest: none

Financial sources: none

¹Research performed at Laboratory of Genetic and Morphology, Department of Pathology, School of Medicine of the University of Brasília (UnB), Brasília, Brazil. Part PhD degree thesis, Postgraduate Program Medical Sciences. University of Brasília – UnB, Tutor: Rivadávio Fernandes Batista Amorim

DECLARAÇÃO

Declaro que o artigo intitulado

“The effect of simvastatin on relapse of tooth movement and bone mineral density in rats measured by a new method using microtomography”

dos autores Giovanni Modesto Vieira, Sacha Braun Chaves, Vânia Maria Moraes Ferreira, Karina Maria Salvatore de Freitas, Rivadávio Fernandes Batista Amorim

foi aceito para publicação em maio/2015
na Revista Acta Cirúrgica Brasileira.



Prof. Saul Goldenberg
Editor Chefe

A modified method for micro-CT of the effect of incyclinide and simvastatin on relapse of tooth movement in rats

Giovanni Modesto Vieira, Denise Falcão, Ricardo Bentes de Azevedo, Rivadávio Fernandes Batista Amorim

Abstracts

Objectives: The objective of this study was to evaluate the effect of incyclinide and simvastatin on relapse of tooth movement in rats using a new method for micro CT as well as the correlation of bone mineral density with tooth recurrence. **Material and methods:** forty adult rats and male Wistar strain, separated into three groups, had stainless steel springs installed on upper left first molars. Rats molars were moved during 18 days, and after removing the springs, were applied by oral gavage, 30mg/kg of incyclinide and 5mg/kg of simvastatin in two experimental groups, and carboxymethylcellulose the 0.5 in the control group, for 20 days. Dental recurrence was visualized with the aid of microtomography CT, and the reconstructed images and chosen through the software N-Recon-1. 6. 9. 4, and Data Viewer 1.5.0.0, had their calibrated measurement guides for the software Image Pro^R plus 5.1. After the sacrifice of animals bone density was analyzed by micro-CT, mesial and distal root of the first molar moved through software CT Analyzer 1.13, and by ANOVA in SPSS-22. **Results:** the recurrence was lower in experimental group relative to the control group, and statistical significance was found between the incyclinide and the control group. **Conclusions:** the incyclinide inhibited the relapse of tooth movement of the periodontal ligament in rats.

Introduction:

Tooth movement recurrence is an understudied phenomenon, which affects 30 to 90 % orthodontic cases along 10 years post-treatment^{1, 2}, beyond the immediate recurrence after removal of the orthodontics devices³.

Its etiology is uncertain, being the classical theory of the overload of the supra-alveolar connective tissue fibers the most accepted one^{4, 5}. Other authors credit their origin in tension and stress that are formed and accumulated in trans-septal fibers and periodontal ligament fibers⁶, as well as increasing the elasticity of the gingival tissues that are compressed towards the tooth movement⁷.

The alveolar bone remodeling and periodontal ligaments are considered the main cause for the tooth movement recurrence². Such fact can be partially explained by the degradation of the extracellular matrix, which conductor is the metalloproteinases (MMPs), enzymes that degrade the periodontal bone tissue, and have an active role in the mechanism of tooth movement⁸.

Fixed retention devices, trying to prevent relapse, usually exceed 12 months to arrange an appropriate time of bone remodeling and periodontal⁹, considering that the remodeling of the fibers supra-alveolar continue for 4 to 6 months after the removal of orthodontic devices¹⁰. Nonetheless, relapsing can still occur. It has been suggested the use of incyclinide (CMT-3)^{11, 12, 13}, and the simvastatin¹⁴ for preventing the phenomenon of recurrence.

The aim of this study was to determine the effect of CMT-3 and simvastatin on relapse of tooth movement periodontal ligament in rats through modified methodology to improve the initial scouting method that only used the tomographic images¹⁵.

Secondarily, it was determined the correlation of bone mineral density of the mesial and distal roots of the upper first molars of murines, with the dental movement induced recurrence, especially the immature bone tissue and little mineralized during the phase of dental recurrence.

Material and methods:

Population and Design

The composition of the sample was of 40 adult male rats of the Wistar rats (*Rattus Norvegicus albinus*), with four months of age, weighing an average of 354 ± 33 grams, that were kept in standardized conditions with feed and water ad libitum, ambient temperature and light-dark cycle of the 12 hours (06:00-18:00) and obeying the criteria in accordance with the norms established by the committee of ethics in animal use (CEUA), University of Brasília (UnB-70872012).

The animals were divided into three groups, with 15 specimens in each experimental group, and 10 in control group. It was placed spiral springs in the first upper left molars, which stayed in active mode for eighteen days. Afterwards, the springs were removed and the rats received drugs diluted in carboxymethylcellulose 0.5 (mv). The control group (group I) received n-methyl pyrrolidone, group II and III received CMT-3 and simvastatin, respectively. A period of twenty days was used as relapse time. On the 39^o day the animals were sacrificed through carbon monoxide gas for a period of 10 minutes.

Tooth Movement and Measurement Protocol

The spiral springs were installed according to the model proposed by Heller & Nanda¹⁶, after the anesthetic induction by ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10mg/kg) An initial force of 75 cN was measured by a dynamometer Correx-branded.

The CMT-3 and simvastatin were administered by oral gavage at dose of 30mg/kg and 5mg/kg, respectively. The stock solution of modified tetracycline was prepared according to the method proposed by Li et al.¹⁷, a gift from the French company Galderma^R. The stock solution of simvastatin was held according to Jabbari et al.¹⁸.

The acquisition of images was accomplished with the aid of a micro scanner Skyscan 1076 in vivo micro-CT-Bruker-microCT, which begat radiographic images micro CT (figure 1), and were later rebuilt with the software N-Recon-1. 6. 9. 4- Bruker-microCT (figure 2).

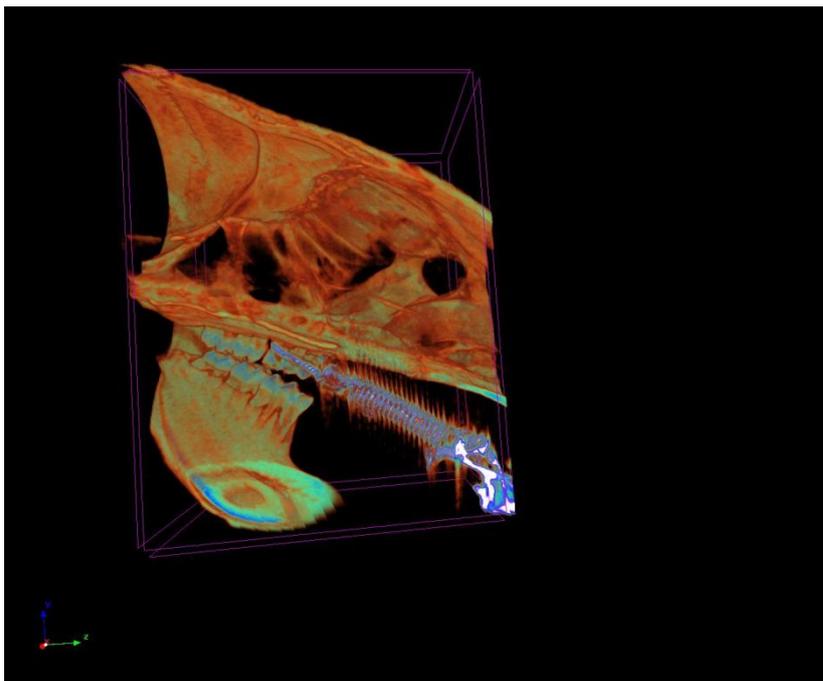


Figure 1: acquisition of image Micro CT

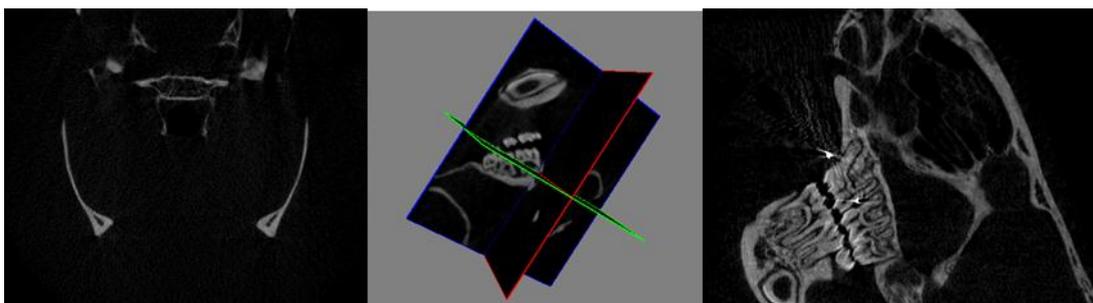


Figure 2: reconstructed Image selected by the system of coordinates x, y, z.

It has been used the time of 7 minutes on each specimen, having as parameters: voltage 100 Kv, 1 mm Al filter, resolution of 35 μm . On reconstruction of images was used the following parameters: minimum value of 0.004915, and maximum value of 0.064752.

In the experiment were conducted three microtomographies outlets respectively: first micro-CT after the installation of the springs in the animals, which ranged from four to seven days, second micro-CT, after eighteen (18) days of tooth movement in all groups, third micro-CT, after twenty (20) days of prescription drugs in their respective groups.

The quantification of the dental movement was accomplished with the aid of the software Data Viewer version 1.5.0.0-Bruker-microCT, who selected the 120 images reconstructed by the software N-Recon- 1.6.9.4.

In the confection of the measuring guides was used the software Image Pro^R plus 5. 1-Media Cybernetics, each composed of a guide line representing the occlusal plane: the mesiobuccal cusp tip of the left upper first molars and cusp tip of this second left molar-vestibular, and drawn two perpendicular to this line, surfacing the most points this root convexity-vestibular of first molars left and the mesiobuccal root of the second left molar for the measurement of the distance between these two

perpendiculars, minimizing errors of arising from the tilt movement and mouse first molars extrusion¹⁹ (figure 3 and 4).

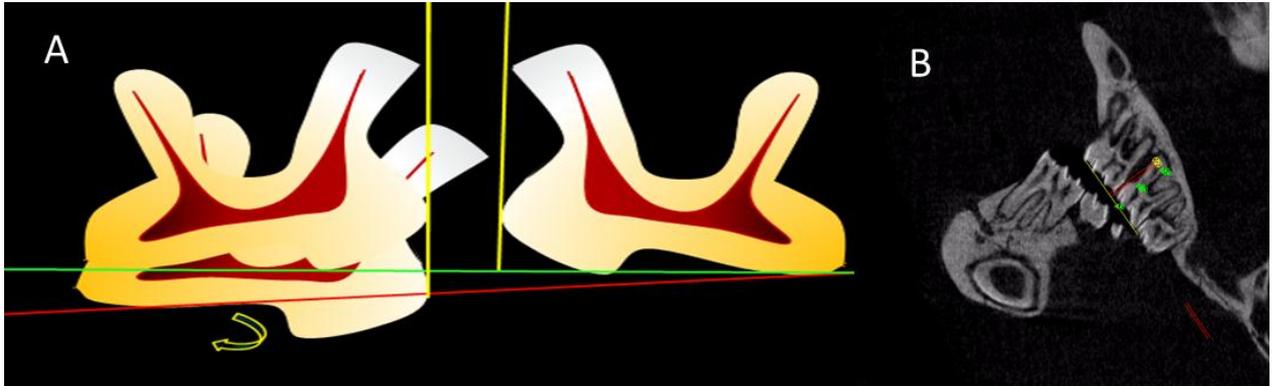


Figure 3: measuring guides: A-Schema representing the extrusion and inclination of the first molars, whose measurement guide minimizes calibration errors between the molars, B- Reconstructed Image chosen with the measuring guides.

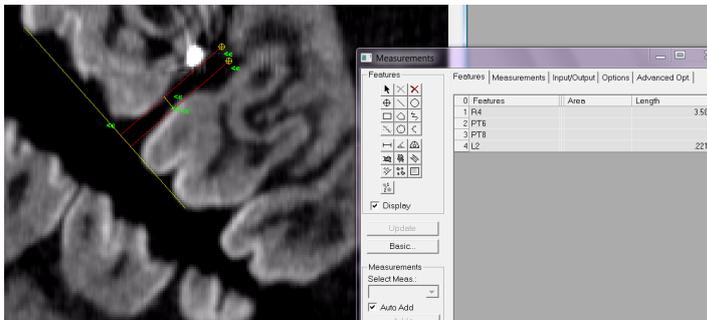


Figure 4: Measurement of tooth movement through reconstructed images

Assessment of Bone Densitometry

Densitometry was performed with the CT Analyzer software 1.13 Bruker micro CT, using tomographic images by Dataviewer software 1.5.0.0 in the sagittal plane. The parameter used for the delimitation of the upper and lower limit, the region comprised by micro CT images, was 544 mm distance between the complete disappearance of the mesial and distal root of a micro-CT image to another image of the same resolution.

The region of interest ROI consisted of a circle of 60 x 60 pixels, which would encompass the mesial and distal root, as well as its surrounding alveolar bone structure, being the criterion used in all micro CT images analyzed (figure 5).

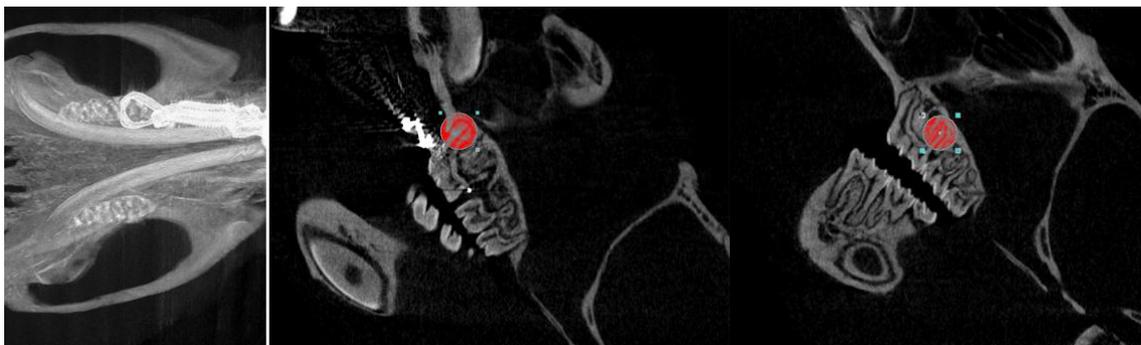


Figure 5: reconstructed Image and marking of the circular area of 60 x 60 pixels in mesial and distal root of the left upper first molars for measurement of bone density in the region bounded

Statistical Analysis

Statistical Analysis Data analyses were performed with Statistical Package for Social Sciences (SPSS® version 20.0 for Windows®, SPSS Inc. /IBM Group, Chicago, USA). All tests were two-sided. Kruskal-Wallis test with a significance level of 0.05 assessed relapse in micro-CT, while ANOVA with a significance level of 0.01 assessed the weight and the bone mineral density (BMD) among groups. Spearman correlation test verified the relationship between bone density and the orthodontic relapse.

Results:

Statistically significant difference was found in the bone densities (represented in Hounsfield unit) of the mesial and distal root, among the three groups studied, with $p=0,001$ and $p=0.000$, with post-hoc test of Tukey stating that the incyclinide was the group that differed as to the BMD final between the three groups studied (figure 6 and 7).

However, the analysis on dental drive end (Rec-end) have shown statistical significance among groups ($p=0.048$), and between the control group and the group of CMT-3, ($p=0.07$) (figure 6). There was no correlation between bone density and the orthodontic relapse in this study, with $p=0.061$ for distal root and $p=-0.282$ for mesial root.

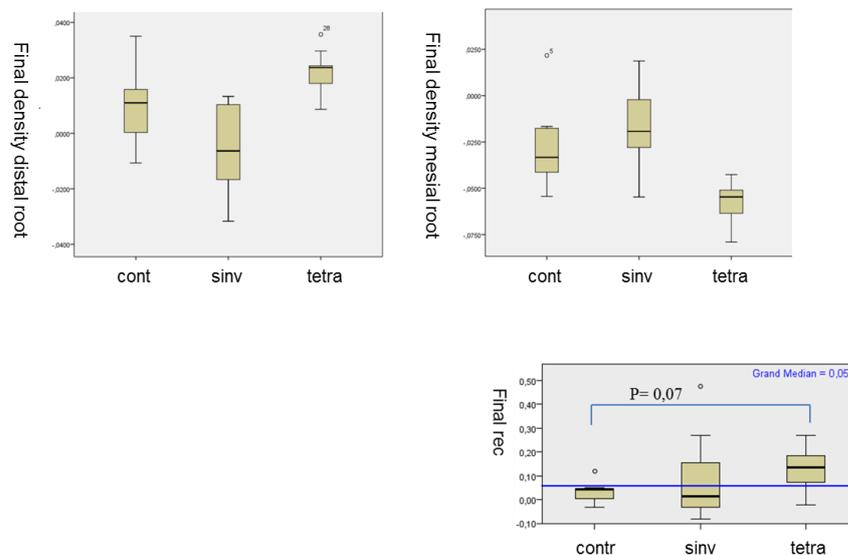


Figure 6: Graph Box plot of bone mineral densitometry and median and percentiles of the differences between groups (final reconstructed Images)

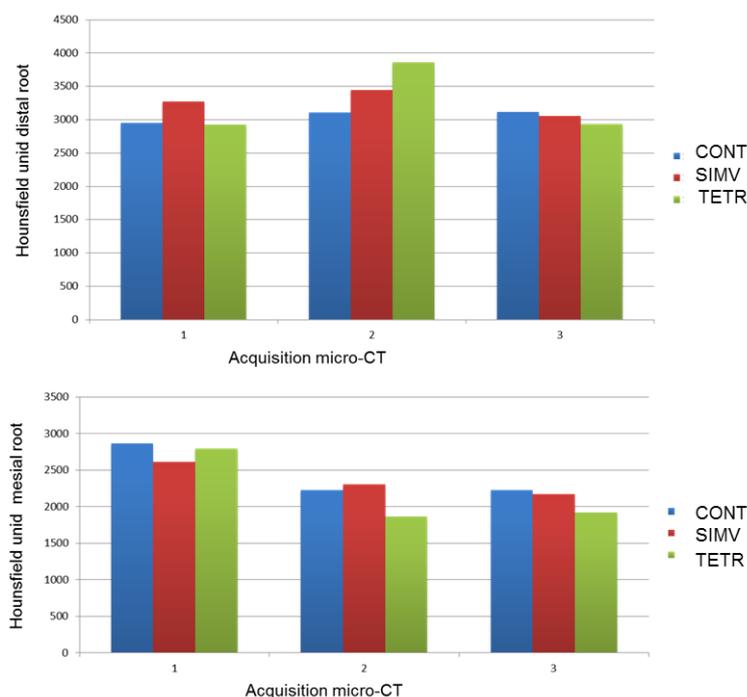


Figure 7: Graph of Hounsfield- Blue-control, Red- simvastatin, Green- tetracycline

Discussion

Orthodontic movement recurrence is a concern during clinical practice and there is a need to develop precise methods to assess the efficacy of drugs that aims to preventing relapses.

During orthodontic movement were found many MMPs in the gingival crevicular fluid on patients undergoing orthodontic treatment, indicating his deep participation in the remodeling of the bone tissue, which occurs during tooth movement induced^{20, 12}.

Golub et al.²¹ discovered the inhibitory effect of chemically modified tetracyclines (CMTs) on the activity of MMPs, with loss of microbial function, but which retains anti-MMP activity. Some of these drugs, such as CMT-3, exerts potent enzyme inhibition to these proteins²², and also affect the recruitment of osteoclasts^{23, 24}.

It is postulated that the CMTs can reduce the expression of MMPs, by competitive inhibition of zinc acts as cofactor of the enzymatic reaction of MMPs, altering the existing balance between the concentration of MMPs and the concentration of their natural tissue inhibitor, the TIMPs²² and being already attested dental drive inhibition by these substances²⁵.

In this experiment the inhibition of orthodontic relapse occurred after use of CMT-3. The MMPs are found on both sides of the affixing and bone resorption, tooth movement during induced^{20, 8}.

But it was necessary to establish the correlation of these findings with bone-density areas, because for some authors the dental movement rate is inversely proportional to the bone density²⁶, and least mineralized bone tissue are more easily refurbished²⁷.

It takes a period of time of at least 14 days for a complete cycle of periodontal ligament remodeling in rats²⁸. But 20 days is sufficient time for the onset of dental, and the appearance of areas of increased bone density that continue for many days after the removal of tooth movement devices²⁸.

According Holliday et al.²³, pressure areas are created on mesial surface and areas of tension on the distal surface in the region of the upper right first molars that is being moved²³.

After the move, there was a decrease in dental bone mineral density in mesiobuccal of the first upper molar root, corroborating the findings of Bridges et al.²⁷ and King et al.²⁸, suggesting that the bone resorption in areas of pressure can precede the bone apposition in areas of tension³⁴.

Second Bridges et al.²⁷, there is a decrease in BMD during the late period of the dental movement, consistent with the formation of an immature bone tissue and low density. However, there was an increase in bone mineral density in the region of distobuccal root, with a predominance of the bone apposition after 18 days of tooth movement, to the detriment of bone resorption. This might be due to the type of tilt movement of upper first molars, creating areas of tension in the cervical third and middle of the root distobuccal^{28, 23}.

During the period of relapse, there was a slight increase in dental bone mineral density on root mesiobuccal in the CMT-3 group, unlike the control group, which attests to the effect of CMT-3 on inhibition of osteoclastic formation²⁹, inhibition of bone resorption²⁴, and maybe inducing apoptosis of osteoclasts³⁰. Furthermore, with the inhibition of MMPs there is not the possibility of connecting the osteoclasts on the bone surface³¹.

Interesting, that at the stage of dental distobuccal root, recurrence occurred a decrease in bone density in the distal root ($p= 0.01$), in the incyclinide group. And this might signal that the inhibitory effect of the drug on the tension side, does not affect the imbalance of extracellular matrix remodeling. Bone mineral density this root returned to values of similar magnitude to the beginning of the dental movement, unlike the control group, whose bone density values continued to soar. And our findings corroborate the work of Zhou et al.²⁴, which found no anabolic effects of CMT-3 or bone formation in the cells of the lineage osteoblastic.

Despite the decreased bone mineral density in the distal root inhibition occurred dental recurrence ($p=0.05$) by incyclinide, probably at the expense of increased bone density, as a result of inhibition of bone resorption in the region from the root mesiobuccal ($p=0.01$), referring to the pressure side. But there was no correlation between bone density and the orthodontic relapse.

Another drug with strands in the various stages of bone remodeling is simvastatin, a drug what acts in the synthesis of mevalonato³².

Although simvastatin suck related to anabolic phase or bone neoformation³², acting in the formation of bone morphogenetic protein (BMP2) in periodonto³² (and increasing bone density) its mechanism of action in catabolic phase is also expressive. Being that it was established to regulate the differentiation of osteoclasts by sinvastatina¹⁴, possibly through the MMP 9, since this enzyme is essential for recruitment of osteoclastos³³.

It was hypothesized that simvastatin may also inhibit relapse, by acting on the recruitment of osteoclasts via metalloproteinases. This is due to the discovery of the need of a byproduct of the mevalonate pathway for the recruitment of osteoclastos³⁴. Simvastatin would act, therefore in recruitment and differentiation of osteoclasts, inhibiting bone remodeling and can inhibit relapse of tooth movement.

However, it was found bone density values decreased in the region from the root mesiobuccal, as distobuccal root. It may be due to low dosage used in the experiment (5mg/kg), or the route of administration that was used. And contrary to studies of Han et al.³⁵ that found inhibiting relapse dental simvastatin (and proposed a mechanism of control of local rate of osteoprotegerin by drug) simvastatin not inhibited dental recurrence in this experiment.

This may attest to the work of Maritz et al.³⁶ what reported that a dose of 20mg/kg is needed to change the rate of bone mineral density in rats.

Conclusion:

The incyclinide inhibited the relapse of tooth movement in rats, and there has been an increase in bone mineral density in side of the mesial root, as well as a decrease in bone mineral density in the distal root side.

There was no inhibition of relapse of tooth movement with the use of simvastatin, and there has been a decrease in bone mineral density at the root distal and mesial after use of this drug.

There was no correlation between bone density and the orthodontic relapse in two drugs object of study.

References:

- 1- Olive RJ, Basford KE. A longitudinal index study of orthodontic stability and relapse. *Aust Orthod J.* 2003;19(2):47-55.
- 2- Franzen JT, Brudvik P, Radunovic VV. Periodontal tissue reaction during orthodontic relapse in rat molars. *Eu J Orthod.* 2013;35(2):152-159.
- 3- Kilica N, Oktay H, Ersoz M. Effects of force magnitude on relapse: An experimental study in rabbits. *Am J Orthod and Dentofacial Orthop.* 2011;140(1): 44–50.
- 4- Reitan K. Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. *Am J Orthod.* 1967;53(10):721–745.
- 5- Parker GR. Transseptal fibers and relapse following bodily retraction of teeth: a histological study. *Am J Orthod.* 1972;61(4):331-344.
- 6- Sadowsky C, Schneider BJ, BeGole EA, Tahir E. Long-term stability after orthodontic treatment: nonextraction with prolonged retention. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1994;106(3):243-9.
- 7- Redlich M, Shoshan S, Palmon A. Gingival response to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1999;116(2):152-158.
- 8- Ingman T, Apajalahit S, Mantyla P, Savolainen P, Sorsa T. Matriz metalloproteinase 1 and 8 in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a pilot study during 1 month of follow-up after fixed appliance activation. *Eur J Orthod.* 2005;27(2):202-207.

- 9- Destang DL, Kerr WJS. Maxillary retention: is longer better? *Eur J Orthod.* 2003; 25(1):65–69.
- 10- Reitan K. Principles of retention and avoidance of post-treatment relapse. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1998;113(5):507-514.
- 11- Bildt MM, Snoek-Van Beurden AMP, Degroot J, Van EL B, Kuijpers-Jagtman AM, Von Den Hoff JW. Chemically modified tetracyclines stimulate matrix metalloproteinase-2 production by periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2006;41(5):463–470.
- 12- Bildt M.M., Bloemen M, Kuijpers-Jagtman A.M, Von Den Hoff W.J. Matriz metalloproteinase inhibitors reduce collagen gel contraction and α -smooth muscle actin expression by periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2009; 44(2):266-274.
- 13- Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;129(4):469-501.
- 14- Grasser W.A, Baumann A.P, Harwood H.J, Devalaraja R, Renkiewicz R, Baragi V, Thompson D.D, Paralkar V.M. Regulation of osteoclast differentiation by statins. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2003;3(1):53-62.
- 15- Vieira G.M, Chaves B.S., Ferreira V.M.M, Freitas K.M.S, Amorim R.F.B. The effect of simvastatin on relapse of tooth movement and bone mineral density in rats measured by a new method using microtomography. *Acta Cir Bras.* 2015 (in the press).
- 16- Heller I. J, Nanda R. Effect of alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod.* 1979;75(3):239-258.
- 17- Li J, Hunynh H, Chan E. Evidence for dissolution rate-limited absorption of Col-3, a matrix metalloproteinase inhibitors, leading to the irregular absorption profile in rats after oral administration. *Pharm Res.* 2002;19(11):1665-1662.
- 18- Jabbari M, Zohreh Rostami J, Jenabi A, Zahedi-Shoolami L, Mooraki A. Simvastatin Ameliorates Gentamicin-Induced Renal Injury in Rats. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2011;22(6):1181-1186.
- 19- Gonzales C, Hotokezaka H, Arai Y, Tadashi Ninomiya T, Tominaga J; Jang I, Hotokezaka Y, Tanaka M, Yoshida N. An in vivo 3D micro-CT evaluation of tooth movement after the application of different force magnitudes in rat molar. *Angle Orthod.* 2009;79(4):703-14.
- 20- Apalajahit S, Sorsa T, Railavo S, Ingman T. The vivo levels of matrix metalloproteinase- 1 and 8 in gingival crevicular fluid during initial orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2003;82(12):1018-1022.
- 21- Golub LM, Lee HM, Lehrer G. Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. *J Periodontal Res.* 1983;18(5):516–526.

-
- 22- Acharya MR, Venitz J, Figg WD, Sparreboom A. Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. *Drug Resist Updat*, 2004;7(3):195-208.
- 23- Holliday LS, Vakani A, Archer L, Dolce C. Effects of metalloproteinase inhibitors on bone resorption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res*. 2003; 82(9):687-691.
- 24- Zhou X, Zhang P, Zhang C, An B, Zhu Z. Tetracyclines inhibit rat osteoclast formation and activity in vitro and affect bone turnover in young rats in vivo. *Calcif Tissue Int*. 2010;86(2):163-171.
- 25- Bildt M. M, Henneman S, Maltha C. J, Kuijpers-Jaktman M. A, Von Der Hoof W.J. CMT-3 inhibits orthodontic tooth displacement in the rat. *Arch Oral Biol*. 2007;52(6):571-578.
- 26- Chugy T, Jain AK, Jaiswal RK, Mehrotra P, Mehrotra R. Bone density and it's importance in orthodontics. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2013;3(2):92-97.
- 27- Bridges T, King G, Mohammed A. The effect of age on tooth movement and mineral density in the alveolar tissues of the rat. *Am J Ortho Dentofac Orthop*. 1988;93(3):245-250.
- 28- King GJ, Keeling SD, Wronski TJ. Histomorphometric study of alveolar bone turnover in orthodontic tooth movement. *Bone*. 1991;12(6):401-409.
- 29- Holmes SG, Still K, Buttle DJ, Bishop NJ, Grabowski PS. Chemically modified tetracyclines act through multiple mechanisms directly on osteoclast precursors. *Bone*. 2004;35(2):471-478.
- 30- Holmes S, Smith S, Borthwick L, Dunford J, Rogers M, Bishop N, Grabowski PS CMT3 alters mitochondrial function in murine osteoclast lineage cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;365(4):840-845.
- 31- Henneman S, Von den Hoff JW, Maltha JC. Mechanobiology of tooth movement. *Eu J Orthod*. 2008;30(3):299-306.
- 32- Singh K. S, Dodward V, Dhariwal G. Simvastatin and periodontal regeneration. *J Pharm Biomed Sci*. 2012;21(25):1- 4.
- 33- Enqsig MT, Chen QJ, Vu TH, Pendersen AC, Therkidsen B, Lund Lr, Henriksen K, Lenhard T, Foged NT, Werb Z, Delaissé JM. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol*. 2000;51(4):879-889.
- 34- Wong B, Lumma W.C, Smith A.M, Sisko J.T, Wright S.D, Cai TQ. Statins suppress THP-1 cell migration and secretion of matrix metalloproteinase 9 by inhibiting geranylgeranylation. *J Leukoc Biol*. 2001;69(6):959-962
- 35- Han G, Chen Y, Hou J, Liu C, Chen C, Zhuang J, Meng W. Effects of simvastatin on relapse and remodeling of periodontal tissues after tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2010;138(5):550-7.

- 36- Maritz F.J, Conradie M.M, Hulley P.A, Gopal R, Hough S. Effect of Statins on Bone Mineral Density and Bone Histomorphometry in Rodents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(10):1636-41.

http://angle.allentrack.net/cgi-bin/main.plexForm.tjy The Angle Orthodontist

Arguivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Baixaki - Noticias, Tecnol... Não é possível exibir esta ...

THE ANGLE ORTHODONTIST

ONLINE MANUSCRIPT SUBMISSION AND PEER REVIEW

IMPORTANT: To ensure proper functionality of this site, both JavaScript and Cookies MUST be enabled. Click here to find out why.

CLICK HERE FOR LINKS TO UPGRADE OR INSTALL ACROBAT READER AND YOUR BROWSER.

[Home](#)

Detailed Status Information

Manuscript #	022015-109
Current Revision #	0
Submission Date	2015-02-20 11:01:16
Current Stage	Initial QC Started
Title	A modified method for micro-CT of the effect of incyclinide and simvastatin on relapse of tooth movement in rats
Running Title	effect of incyclinide and simvastatin on relapse
Manuscript Type	Original Article
Special Section	N/A
Corresponding Author	Giovanni Vieira (University of Brasilia)
Contributing Authors	Denise Rocha , Ricardo Bentes azevedo Azevedo , Rivadávio Fernandes Batista amorim Amorim
Financial Disclosure	I have no relevant financial interests in this manuscript.
Abstract	Objectives: The objective of this study was to evaluate the effect of incyclinide and simvastatin on relapse of tooth movement in rats using a new method for micro CT as well as the correlation of bone mineral density with tooth recurrence. Material and methods: forty adult rats and male Wistar strain, separated into three groups, had stainless steel springs installed on upper left first molars. Rats molars were moved during 18 days, and after removing the springs, were applied by oral gavage, 30mg/kg of incyclinide and 5mg/kg of simvastatin in two experimental groups, and carboxymethylcellulose the 0.5 in the control group, for 20 days. Dental recurrence was visualized with the aid of microtomography CT, and the reconstructed images and chosen through the software N-Recon-1. 6. 9. 4, and Data Viewer 1.5.0.0, had their calibrated measurement guides for the software Image ProR plus 5.1. After the sacrifice of animals bone density was analyzed by micro-CT,

http://angle.allentrack.net/cgi-bin/main.plexForm.tjy The Angle Orthodontist

Arguivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Baixaki - Noticias, Tecnol... Não é possível exibir esta ...

Manuscript Type	Original Article
Special Section	N/A
Corresponding Author	Giovanni Vieira (University of Brasilia)
Contributing Authors	Denise Rocha , Ricardo Bentes azevedo Azevedo , Rivadávio Fernandes Batista amorim Amorim
Financial Disclosure	I have no relevant financial interests in this manuscript.
Abstract	Objectives: The objective of this study was to evaluate the effect of incyclinide and simvastatin on relapse of tooth movement in rats using a new method for micro CT as well as the correlation of bone mineral density with tooth recurrence. Material and methods: forty adult rats and male Wistar strain, separated into three groups, had stainless steel springs installed on upper left first molars. Rats molars were moved during 18 days, and after removing the springs, were applied by oral gavage, 30mg/kg of incyclinide and 5mg/kg of simvastatin in two experimental groups, and carboxymethylcellulose the 0.5 in the control group, for 20 days. Dental recurrence was visualized with the aid of microtomography CT, and the reconstructed images and chosen through the software N-Recon-1. 6. 9. 4, and Data Viewer 1.5.0.0, had their calibrated measurement guides for the software Image ProR plus 5.1. After the sacrifice of animals bone density was analyzed by micro-CT, mesial and distal root of the first molar moved through software CT Analyzer 1.13, and by ANOVA in SPSS-22. Results: the recurrence was lower in experimental group relative to the control group, and statistical significance was found between the incyclinide and the control group. Conclusions: the incyclinide inhibited the relapse of tooth movement of the periodontal ligament in rats.
Assistant Editor	Not Assigned
Key Words	Recurrence, X-ray microtomography, Densitometry, Simvastatin, Tetracycline
Conflict of Interest	I have no conflict of interest that I should disclose.

Stage	Start Date	End Date	Approximate Duration
Initial QC Started	2015-02-20 13:34:34		
Author Approved Converted Files	2015-02-20 13:34:34		
Waiting for Author Approval of Converted Files	2015-02-20 13:13:03		
File Conversion Complete	2015-02-20 13:13:02		
Waiting for File Conversion	2015-02-20 13:11:25		
Waiting for Files to be Sorted	2015-02-20 13:09:03		
Manuscript Submitted	2015-02-20 13:09:03		
Manuscript Files Submitted	2015-02-20 13:09:03		
Preliminary Manuscript Data Submitted	2015-02-20 13:03:04		