



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Clínica Infantil



MARIA CECÍLIA GORITA DOS SANTOS

**INFLUÊNCIA DA DOXICICLINA (SDD) EM RATAS OSTEOPÊNICAS, SOBRE O
PERIODONTO DE SUSTENTAÇÃO, APÓS A MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA
INDUZIDA ORTODONTICAMENTE**

Ribeirão Preto

2023

MARIA CECÍLIA GORITA DOS SANTOS

**INFLUÊNCIA DA DOXICICLINA (SDD) EM RATAS OSTEOPÊNICAS, SOBRE O
PERIODONTO DE SUSTENTAÇÃO, APÓS A MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA
INDUZIDA ORTODONTICAMENTE**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani.

VERSÃO ORIGINAL

Ribeirão Preto

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP – Ribeirão Preto

Santos, Maria Cecília Gorita dos

Influência da doxiciclina (SDD) em ratas osteopênicas, sobre o periodonto de sustentação, após a movimentação dentária induzida ortodonticamente. Ribeirão Preto, 2023.

93p. : il. ; 30 cm

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora Maria Bernadete Sasso Stuani.

Versão Original

1. Ortodontia. 2. Movimentação dentária. 3. Remodelação óssea. 4. Ovariectomia. 5. Doxiciclina. 6. Alendronato de Sódio. 7. Osteoporose.

MARIA CECÍLIA GORITA DOS SANTOS

Influência da doxiciclina (SDD) em ratas osteopênicas, sobre o periodonto de sustentação, após a movimentação dentária induzida ortodonticamente

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontopediatria do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Aos meus pais, com amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À agência de fomento CAPES pela bolsa de doutorado concedida e à FAPESP pelo suporte financeiro a esta pesquisa.

À Universidade de São Paulo, na pessoa do atual reitor, Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Diretor, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da atual Coordenadora, Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato.

Aos meus pais, pela minha vida e por tudo aquilo que foi possível.

Aos meus irmãos, por toda ajuda e compreensão.

À minha orientadora, Prof. Dr. Maria Bernadete Sasso Stuani, pela atenção, paciência e persistência incondicional para o meu crescimento pessoal e profissional.

Às minhas queridas amigas, Patrícia Maria Monteiro e Carolina Maschietto Pucinelli, pelo norte acadêmico.

Aos meus amigos, pelo apoio durante este processo.

RESUMO

DOS SANTOS, M. C. G. Influência da doxiciclina (SDD) em ratas osteopênicas, sobre o periodonto de sustentação, após a movimentação dentária induzida ortodonticamente. 2023, 93p. Tese (Doutorado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Introdução: O fechamento de espaços no arco dentário por meio da movimentação dentária ortodôntica é um grande desafio, principalmente em pacientes com osteoporose. **Objetivos:** Comparar o efeito do uso da doxiciclina em doses subantimicrobianas (DDS) com o alendronato de sódio (ALN), após a movimentação dentária induzida ortodonticamente (MDIO), nos seguintes parâmetros: 1) variação da massa corpórea; 2) taxa de movimento dentário; quantificação histomorfométrica do osso na região de furca do dente movimentado; e 3) expressão dos genes *Tnfrsf11a* (RANK), *Tnfrsf11* (RANKL), *Tnfrsf11b* (OPG), através do PCR-RT. **Materiais e Métodos:** Foram utilizadas 96 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), distribuídas aleatoriamente em seis grupos: SHAM (Controle Negativo – operação falsa); DOX (ratas expostas à doxiciclina 30 mg/kg/dia); ALN (ratas expostas ao alendronato de sódio 0,7 mg/kg/semana); OVX (ratas ovariectomizadas); OVX+DOX (ratas ovariectomizadas expostas à doxiciclina 30 mg/kg/dia); OVX+ALN (ratas ovariectomizadas expostas ao alendronato de sódio 0,7 mg/kg/semana). Todos os grupos, com exceção do SHAM, tiveram seus modelos de indução à osteopenia por 90 dias, e, em seguida, os grupos que receberam o medicamento foram submetidos às doses de 30 mg/kg/dia (doxiciclina) ou 0,7 mg/kg/semana (alendronato de sódio), ambos por 60 dias. O período experimental total foi de 150 dias. A movimentação ortodôntica foi realizada durante as duas últimas semanas de administração das medicações. Para isso, usou-se uma mola fechada de níquel-titânio entre o primeiro molar superior direito e os incisivos centrais. O primeiro molar superior esquerdo foi utilizado como controle, sem movimentação em todos os grupos. O peso das ratas foi aferido semanalmente. Após a eutanásia dos animais, as maxilas foram removidas e processadas para avaliação microscópica, para análise do osso alveolar e quantificação da movimentação dentária, e para o PCR-RT. Os resultados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA; havendo diferenças, o post-test de Tukey foi realizado para especificar as diferenças, ambos com significância de $p \leq 0,05$. **Resultados:** Houve aumento da massa corpórea em todos os animais ao final do experimento, com diferença estatisticamente significativa, quando comparou-se os grupos que sofreram ovariectomia, com os seus respectivos controles. Houve movimentação significativa nos dois períodos de observação, ($p < 0,05$) em todos os grupos, em comparação aos lados sem movimentação. Entretanto, no grupo ovariectomizado houve maior quantidade de movimentação dentária induzida, comparado com os outros grupos, com resultado estatisticamente significativo aos 7 e 14 dias, com $p \leq 0,05$. Em relação à porcentagem de osso formado, observou-se que no período 7 dias houve uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) nos grupos que sofreram ovariectomia (OVX, OVX+DOX e OVX+ALN), e no período de 14 dias, a porcentagem de osso voltou a subir em todos os grupos, sendo esse aumento mais expressivo nos grupos tratados com ALN e DOX, e menor no grupo OVX. Em relação à expressão gênica, a DOX e ALN foram capazes de aumentar a expressão, tanto do RANKL quanto da OPG. O grupo OVX apresentou o menor “turnover” ósseo no início do processo de reparo alveolar, representado pela relação de OPG/RANKL, porém apresentou uma brusca diminuição aos 14 dias. **Conclusão:**

Neste modelo experimental, a ovariectomia atrasou o processo de reparo alveolar e alterou o turnover ósseo após a aplicação da força ortodôntica. O alendronato de sódio, na dosagem empregada, diminuiu a quantidade de movimentação dentária induzida, em comparação ao grupo OVX, sendo similar ao grupo controle, e o uso da doxiciclina em doses subantimicrobianas (DDS) teve um papel chave na remodelação óssea e contribuiu positivamente em ossos de ratas acometidas pela osteopenia induzida por ovariectomia, podendo ser um substituto ao ALN; porém, os valores iniciais da histometria e expressão gênica da tríade RANK-RANL-OPG não foram restabelecidos completamente.

Palavras-chave: Ortodontia. Movimentação dentária. Remodelação óssea. Ovariectomia. Doxiciclina. Alendronato de Sódio. Osteoporose.

ABSTRACT

DOS SANTOS, M. C. G. Influence of doxycycline (SDD) in osteopenic rats on the support periodontium after orthodontic tooth movement. 2023, 93p. Thesis (Doctorate degree in Pediatric Dentistry) - School of Dentistry of Ribeirao Preto, University of São Paulo, Ribeirao Preto, 2023.

Introduction: The closure of spaces in the dental arch through orthodontic tooth movement is a great challenge, especially in patients with osteoporosis. **Objectives:** To compare the effect of the use of doxycycline in subantimicrobial doses (DDS) with sodium alendronate (ALN), which is the standard drug for the treatment of osteoporosis, after orthodontically induced tooth movement (MDIO), in the following parameters: 1) variation of body mass; 2) the rate of tooth movement; histomorphometric quantification of the bone in the furca region of the moved tooth; and 3) expression of the genes *Tnfrsf11a* (RANK), *Tnfsf11* (RANKL), *Tnfrsf11b* (OPG), through PCR-RT. **Materials and Methods:** 96 female Wistar rats (*Rattus norvegicus*), randomly distributed in six groups: SHAM (Negative Control – false operation); DOX (rats exposed to doxycycline 30 mg/kg/day); ALN (rats exposed to sodium alendronate 0.7 mg/kg/week); OVX (ovariectomized rats); OVX+DOX (ovariectomized rats exposed to doxycycline 30 mg/kg/day); OVX+ALN (ovariectomized rats exposed to sodium alendronate 0.7 mg/kg/week). All groups, with the exception of SHAM, had their osteopenia induction models for 90 days, and then the groups that received the drug were submitted to doses of 30 mg/kg/day (doxycycline) or 0.7 mg/kg/week (sodium alendronate), both for 60 days. The total experimental period was 150 days. Orthodontic movement was performed during the last two weeks of medication administration, using a closed nickel-titanium spring between the first right upper molar and the central incisors. The first, left upper molar was used as a control without movement in all groups. The weight of the rats was measured weekly on a precision scale in the vivarium. After euthanasia of the animals, the maxillae were removed and processed for microscopic evaluation for analysis of the alveolar bone and quantification of tooth movement, and for RT-PCR, evaluating the gene expression of *Tnfrsf11a* (RANK), *Tnfsf11* (RANKL), *Tnfrsf11b* (OPG). The results were submitted to the ANOVA statistical test, with differences in Tukey's post-test was performed to specify the differences, both with significance of $p \leq 0.05$. **Results:** There was an increase in body mass in all animals at the end of the experiment, with a statistically significant difference when comparing the groups that underwent ovariectomy with their respective controls. There was significant movement in the two observation periods ($p < 0.05$) in all groups compared to the sides without movement. However, in the ovariectomized group there was a greater amount of induced tooth movement compared to the other groups, with a statistically significant result at 7 and 14 days, with $p \leq 0.05$. Regarding the percentage and bone formed, it was observed that in the period seven days there was a statistically significant decrease ($p < 0.0001$) in the groups that underwent ovariectomy (OVX, OVX+DOX and OVX+ALN), and in the period of 14 days the percentage of bone rose again in all groups, and this increase was more expressive in the groups treated with ALN and DOX and lower in the OVX group. Regarding gene expression, DOX and ALN were able to increase the expression of both RANKL and OPG. The OVX group presented the lowest bone turnover at the beginning of the alveolar repair process represented by the PG/RANKL ratio, but presented a sharp decrease at 14 days. **Conclusion:** In this experimental model, ovariectomy delayed the alveolar

repair process and altered bone turnover after the application of orthodontic force. Sodium alendronate at the dosage used decreased the amount of tooth movement induced compared to the OVX group, being similar to the control group. The use of doxycycline in subantimicrobial doses (DDS), had a key role in bone remodeling and contributed positively in bones of rats affected by ovariectomy-induced osteopenia, and may be a substitute for ALN, but did not completely reestablish the initial values of histometry and gene expression of the RANK-RANL-OPG triad.

Key-words: Orthodontics. Tooth movement. Bone remodeling. Ovariectomy. Doxycycline. Sodium Alendronate. Osteoporosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** **A:** Fotografia mostrando o primeiro molar superior direito. **B:** Fio de amarrilho adaptado abaixo do ponto de contato entre o primeiro e segundo molar superior. **C:** Mola de Ni-Ti adaptada ao primeiro molar superior. **D:** Mola ativada em posição..... **37**
- Figura 2:** Corte microscópico da maxila de rata Wistar, ilustrando o primeiro (M1) e segundo (M2) molares superiores. As barras entre M1 e M2 representam as três medidas da distância interdentária. Aumento original 4x. H&E..... **47**
- Figura 3:** **A e B:** Corte microscópico do primeiro molar superior. O contorno representa o limite ósseo estabelecido entre as raízes mesial e distal. Aumento original 10x (**A**) e 20x (**B**). **C:** Representação das telas do software Image Pro Plus®, versão 4.5, ilustrando as medidas do osso inter-radicular do primeiro molar superior. Coloração: Tricrômico de Mason. **47**
- Figura 4:** **A:** Evolução da massa corpórea das ratas, nos diferentes grupos, de acordo o tempo analisado (semanas). **B:** Gráfico da média e desvio padrão, da massa corpórea das ratas, nos diferentes grupos analisados durante o experimento. ANOVA, pós-teste Tukey (p 0.001)..... **51**
- Figura 5:** Evolução da taxa de movimentação dentária nos diferentes grupos analisados, durante o período experimental de 14 dias..... **53**
- Figura 6:** Distância média (μm) \pm desvio padrão entre o primeiro e o segundo molar superior nos grupos controle (Sham), ovariectomizado (OVX), tratados com alendronato de sódio (ALN), com doxiciclina (DOX), ovariectomizado tratados com alendronato de sódio (OVX+ALN), ovariectomizado tratados com doxiciclina (OVX+DOX), com movimentação dentária por 7 e 14 dias, comparado com o dia 0. Aumento significativo da distância para o grupo OVX e OVX+DOX, em relação aos demais grupos, após 7 e 14 dias. *p<0,05, ** p<0,001, *** p<0,0001. ANOVA, pós-teste Tukey..... **54**
- Figura 7:** Distância média (μm) \pm desvio padrão entre o primeiro e o segundo molar superior nos grupos controle (Sham), ovariectomizado (OVX), tratados com alendronato de sódio (ALN), com doxiciclina (DOX), ovariectomizado tratados com alendronato de sódio (OVX+ALN),

	ovarietomizado tratados com doxiciclina (OVX+DOX), com movimentação dentária por 7 e 14 dias, comparado com o dia 0. Aumento significativo da distância para o grupo OVX e OVX+DOX, em relação aos demais grupos, após 7 e 14 dias. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. ANOVA, pós-teste Tukey.....	54
Figura 8:	Porcentagem média \pm desvio padrão de osso inter-radicular do primeiro molar superior grupos ovariectomizado (OVX), tratados com alendronato de sódio (ALN), com doxiciclina (DOX), ovariectomizado tratados com alendronato de sódio (OVX+ALN), ovariectomizado tratados com doxiciclina (OVX+DOX), com movimentação dentária por 7 e 14 dias, comparado com o controle (Sham). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. ANOVA, pós-teste Tukey.....	55
Figura 9:	Porcentagem média \pm desvio padrão de osso inter-radicular do primeiro molar superior grupos ovariectomizado (OVX), tratados com alendronato de sódio (ALN), com doxiciclina (DOX), ovariectomizado tratados com alendronato de sódio (OVX+ALN), ovariectomizado tratados com doxiciclina (OVX+DOX), com movimentação dentária por 7 e 14 dias, comparado com o controle (Sham). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. ANOVA, pós-teste Tukey.....	56
Figura 10:	Evolução da porcentagem de osso inter-radicular nos diferentes grupos analisados, durante o período experimental de 14 dias.....	56
Figura 11:	Comparação intra-grupo. Foram calculados os efeitos da dose subantimicrobiana de doxiciclina (DOX) sobre a expressão de OPG níveis de mRNA monitorados em tecido ósseo, apresentados pela proporção: nível de expressão de mRNA/GAPDH.mRNA (razão de produtos de PCR para o gene alvo/GAPDH medido em PCR-RT. Os dados representam a média e desvio padrão (DP). Os dados foram coletados das amostras isoladas do tecido ósseo de 1) SHAM, 2) doxiciclina (DOX), 3) alendronato (ALN), 4) ovariectomizado (OVX), 5) ovariectomizado + doxiciclina (OVX+DOX), 6) ovariectomizado + alendronato (OVX+ALN); no dia-7 e no dia-14. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA, seguida do teste de Tukey).....	57
Figura 12:	Comparação inter-grupo. Foram calculados os efeitos da dose subantimicrobiana de doxiciclina (DOX) sobre a expressão de OPG níveis de mRNA monitorados em tecido ósseo, apresentados pela proporção: nível de expressão de mRNA/GAPDH.mRNA (razão de	

produtos de PCR para o gene alvo/GAPDH medido em PCR-RT. Os dados representam a média e desvio padrão (DP). Os dados foram coletados das amostras isoladas do tecido ósseo de 1) SHAM, 2) doxiciclina (DOX), 3) alendronato (ALN), 4) ovariectomizado (OVX), 5) ovariectomizado + doxiciclina (OVX+DOX), 6) ovariectomizado + alendronato (OVX+ALN); no dia-7 e no dia-14. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA, seguida do teste de Tukey).....

58

Figura 13: Comparação intra-grupo. Foram calculados os efeitos da dose subantimicrobiana de doxiciclina (DOX) sobre a expressão de RANKL níveis de mRNA monitorados em tecido ósseo, apresentados pela proporção: nível de expressão de mRNA/GAPDH.mRNA (razão de produtos de PCR para o gene alvo/GAPDH medido em PCR-RT. Os dados representam a média e desvio padrão (DP). Os dados foram coletados das amostras isoladas do tecido ósseo de 1) SHAM, 2) doxiciclina (DOX), 3) alendronato (ALN), 4) ovariectomizado (OVX), 5) ovariectomizado + doxiciclina (OVX+DOX), 6) ovariectomizado + alendronato (OVX+ALN); no dia-7 e no dia-14. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA, seguida do teste de Tukey).....

58

Figura 14: Comparação inter-grupo. Foram calculados os efeitos da dose subantimicrobiana de doxiciclina (DOX) sobre a expressão de RANKL níveis de mRNA monitorados em tecido ósseo, apresentados pela proporção: nível de expressão de mRNA/GAPDH.mRNA (razão de produtos de PCR para o gene alvo/GAPDH medido em PCR-RT. Os dados representam a média e desvio padrão (DP). Os dados foram coletados das amostras isoladas do tecido ósseo de 1) SHAM, 2) doxiciclina (DOX), 3) alendronato (ALN), 4) ovariectomizado (OVX), 5) ovariectomizado + doxiciclina (OVX+DOX), 6) ovariectomizado + alendronato (OVX+ALN); no dia-7 e no dia-14. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA, seguida do teste de Tukey).....

59

Figura 15: Comparação intra-grupo. Foram calculados os efeitos da dose subantimicrobiana de doxiciclina (DOX) sobre a expressão de RANK níveis de mRNA monitorados em tecido ósseo, apresentados pela proporção: nível de expressão de mRNA/GAPDH.mRNA (razão de produtos de PCR para o gene alvo/GAPDH medido em PCR-RT. Os dados representam a média e desvio padrão (DP). Os dados foram coletados das amostras isoladas do tecido ósseo de 1) SHAM, 2)

doxiciclina (DOX), 3) alendronato (ALN), 4) ovariectomizado (OVX), 5) ovariectomizado + doxiciclina (OVX+DOX), 6) ovariectomizado + alendronato (OVX+ALN); no dia-7 e no dia-14. *p<0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001 (ANOVA, seguida do teste de Tukey).....

60

Figura 16: Comparação inter-grupo. Foram calculados os efeitos da dose subantimicrobiana de doxiciclina (DOX) sobre a expressão de RANK níveis de mRNA monitorados em tecido ósseo, apresentados pela proporção: nível de expressão de mRNA/GAPDH.mRNA (razão de produtos de PCR para o gene alvo/GAPDH medido em PCR-RT. Os dados representam a média e desvio padrão (DP). Os dados foram coletados das amostras isoladas do tecido ósseo de 1) SHAM, 2) doxiciclina (DOX), 3) alendronato (ALN), 4) ovariectomizado (OVX), 5) ovariectomizado + doxiciclina (OVX+DOX), 6) ovariectomizado + alendronato (OVX+ALN); no dia-7 e no dia-14. *p<0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001 (ANOVA, seguida do teste de Tukey).....

61

Figura 17: Evolução da expressão do RANKL níveis de mRNA e OPG níveis de mRNA, durante o período experimental. Os dados foram coletados das amostras isoladas do tecido ósseo de 1) SHAM, 2) doxiciclina (DOX), 3) alendronato (ALN), 4) ovariectomizado (OVX), 5) ovariectomizado + doxiciclina (OVX+DOX), 6) ovariectomizado + alendronato (OVX+ALN); no dia-7 e no dia-14. *p<0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001 (ANOVA, seguida do teste de Tukey).....

62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Grupos experimentais, tempos, número de animais e procedimentos propostos.....	33
Tabela 2:	Comparação do peso médio (gramas) \pm desvio padrão, entre grupos de tratamento, comparando-se os grupos de indução medicamentosas com suas respectivas doses ($p < 0,05$). Legenda: Média (Desvio padrão)..	50
Tabela 3:	Comparação do peso médio (gramas) \pm desvio padrão, entre grupos individualmente, demonstrando as diferenças individuais ($p < 0,05$). Legenda: Média (Desvio padrão)	50
Tabela 4:	Distância média (μm) \pm desvio padrão entre o primeiro e o segundo molar superior nos grupos controle (Sham), ovariectomizado (OVX), tratados com alendronato de sódio (ALN), com doxiciclina (DOX), ovariectomizado tratados com alendronato de sódio (OVX+ALN), ovariectomizado tratados com doxiciclina (OVX+DOX), com movimentação dentária por 7 e 14 dias, comparado com o dia 0. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. ANOVA, pós-teste Tukey.....	52
Tabela 5:	Porcentagem média \pm desvio padrão de osso inter-radicular do primeiro molar superior grupos ovariectomizado (OVX), tratados com alendronato de sódio (ALN), com doxiciclina (DOX), ovariectomizado tratados com alendronato de sódio (OVX+ALN), ovariectomizado tratados com doxiciclina (OVX+DOX), com movimentação dentária por 7 e 14 dias, comparado com o controle (Sham). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. ANOVA, pós-teste Tukey.....	54

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ALN	Alendronato
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E217β-estradiol	Estrógeno
FDA	Food and Drug Administration
HE	Hematoxilina e eosina
Kg	Kilograma
MDI	Movimentação dentária induzida
Mg	Miligrama
OPG	Osteoprotegerina
OVX	Ovariectomia, ratas ovariectomizadas
PBS	Solução salina tamponada com fosfato a 0,1M
PBS+Tx	Solução salina tamponada com fosfato a 0,1M associado ao triton X100
RANK	Receptor ativador do fator nuclear-B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear-B
TNF-β	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
MI	Microlitro
Mm	micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
3. PROPOSIÇÃO	29
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Tipo de estudo.....	32
4.2 Cálculo amostral	32
4.3 Delineamento experimental.....	32
4.4 Manipulação da amostra	34
4.4.1 Anestesia nos animais.....	34
4.4.2 Procedimento de ovariectomia	35
4.4.3 Administração de Alendronato	35
4.4.4 Administração de Doxiciclina	36
4.4.5 Instalação e ativação do dispositivo ortodôntico para a movimentação dentária	36
4.4.6 Eutanásia dos animais e coleta dos espécimes para análises	38
4.4.7 Processamento Histológico	38
4.4.7.1 Coloração dos cortes para microscópio de luz.....	40
4.4.8 Análise da expressão gênica	41
4.4.8.1 Extração do RNA total	42
4.4.8.2 Síntese do DNA complementar (cDNA).....	43
4.4.8.3 PCR em tempo real (qRT-PCR)	44
4.5 Análises realizadas	44
4.5.1 Análise do peso.....	44
4.5.2 Taxa de movimentação dentária	44
4.5.3 Porcentagem de osso	45
4.5.4 Expressão gênica.....	47
4.6 Análise estatística	48

5. RESULTADOS.....	49
5.1 Peso dos animais.....	50
5.2 Taxa de movimentação dentária.....	51
5.3 Porcentagem de osso inter-radicular.....	54
5.4 Expressão gênica.....	56
5.4.3 RANK.....	60
6. DISCUSSÃO.....	63
7. CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	81

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas enfrentados pela odontologia é a perda dental, que poderá acarretar dano estético, funcional, psicológico e social ao paciente. Portanto, o reestabelecimento da área na qual ocorreu a perda dentária é fundamental, e uma das opções para tal reestabelecimento é o fechamento de espaços com movimentação dentária ortodôntica. Entretanto, existe um grande desafio neste tipo de abordagem clínica, principalmente em pacientes acometidos pela osteoporose.

A osteoporose, segundo definição da Organização Mundial de Saúde (OMS), é uma patologia sistêmica e caracterizada pela redução da massa e pela deterioração da microarquitetura do tecido ósseo. Sendo assim, essa patologia compromete a resistência óssea e aumenta o risco de fraturas (JOHNELL; KANIS, 2006). No mundo, mais de 200 milhões de pessoas são acometidas por essa doença. Sabe-se que mulheres no ciclo pós-menopausa são o grupo mais acometido, haja vista que neste período ocorre uma queda de estrógeno no organismo, a deficiência estrogênica exacerba a perda óssea por intermédio do aumento na síntese e ativação de osteoclastos (TANAKA et al., 2002; DUARTE et al., 2004) e, conseqüentemente, ocorre o aumento da síntese de IL-1, TNF- α e da proteína RANKL (HSU; PACIFICI, 2018). Assim, um modelo estabelecido por mimetizar a pós-menopausa é o animal ovariectomizado, uma vez que tal procedimento provoca redução estrogênica (BONNET et al., 2007) e aumenta a osteoclastogênese (GOVIDARAJAN et al., 2013), induzindo a osteopenia, sendo comumente utilizado em pesquisas acerca desta patologia.

Com o objetivo de tratar e prevenir as fraturas ósseas decorrentes da osteoporose, os bisfosfonatos são os medicamentos de primeira escolha, sendo o Alendronato de sódio (ALN) o mais utilizado. Atualmente, os bisfosfonatos estão entre os medicamentos mais indicados na clínica médica para o tratamento de estados osteopênicos e osteoporóticos (ROSEN; BILEZIKIAN, 2001). Os efeitos positivos do ALN decorrem principalmente da capacidade de inibir osteoclastos (AZUMA et al., 1995), inibindo, assim, a reabsorção óssea (IWAMOTO et al., 2009; LERNER, 2006). Este composto apresenta uma forte afinidade pelo cálcio circulante e das superfícies ósseas; inibe a atividade enzimática nos osteoclastos, impedindo a dissolução óssea e a degradação do colágeno, permanecendo no osso por muitos

anos (KIMMEL, 2007). Ao ser transportado, juntamente com os componentes isolados do osso, através do citoplasma dos clastos, o ALN induz eventos bioquímicos capazes de iniciar a morte celular programada dessas células (FLANAGAN; CHAMBERS, 1991; HUGHES et al., 1995; RUSSEL; ROGERS, 1999).

Contudo, como o ALN está associado a uma diminuição de marcadores de turnover ósseo (ORWOLL et al., 2000), há, como consequência, relatos da ocorrência de osteonecrose em pacientes expostos a este medicamento (BEDOGNI et al., 2010; PAIVA-FONSCECA et al., 2014). Além disso, em relato de casos clínicos, de pacientes submetidos a tratamentos com bifosfonatos por longo período, tem-se observado menores taxas de movimentação dentária, dificultando o tratamento ortodôntico (ZAHROWSKI, 2007; RINCHUSE et al., 2007).

Em contrapartida, a doxiciclina (DOX) é um medicamento pertencente à família das tetraciclina e recebe destaque terapêutico pelo seu amplo espectro de ação e baixo efeito colateral (ROBERTS, 2003). Comumente, é utilizada pela ação antimicrobiana, além de ser utilizada, também, como inibidor de metaloproteinases de matriz (MMP), em doses subantimicrobianas (DDS) (GOMES et al., 2017; EMINGIL et al., 2004). Golub et al. (1983) mostraram que a DOX, em dose subantimicrobiana (DDS), é capaz de inibir colagenases, e propuseram que essa propriedade poderia ser útil no tratamento da doença periodontal. Assim, este fármaco vem sendo usado na periodontia como coadjuvante em pacientes nos quais a terapia mecânica isolada não apresentou resultados satisfatórios. A DOX tem atividade inibitória em várias citocinas pró-inflamatórias, como as IL-1 β e TNF- α (EMINGIL et al., 2011; KINANE et al., 2011), e, também, uma alta eficácia no processo de inibição da diferenciação osteoclástica, utilizando-se modelos de estudo “in vitro” e “in vivo” (FRANCO et al., 2011). Estudos confirmaram o efeito benéfico da doxiciclina no tecido ósseo alveolar de pacientes portadores de doença periodontal (GOLUB et al., 2001; PRESHAW et al., 2004; CATON et al., 2004) e também em ratos machos, após indução de diabetes (TELLA et al., 2014).

Baseados nesse mecanismo de ação reconhecido, vários estudos clínicos em pacientes portadores de diferentes estágios de periodontite têm demonstrado que a terapia coadjuvante com dose subantimicrobiana da doxiciclina promoveu uma melhora significativa nos parâmetros clínicos periodontais (GÜRKAN et al., 2008; NOVAK et al., 2008, EMINGIL et al., 2006; HAFFAJEE et al., 2008, WALKER et al.,

2007). Em decorrência desses resultados clínicos satisfatórios obtidos com a doxiciclina, torna-se plausível a hipótese de que este fármaco também possa atuar em outras vias relacionadas com a resposta imuno-inflamatória, no caso da movimentação dentária ortodôntica.

Paralelamente, reconhece-se que o tratamento ortodôntico tornou-se mais acessível à população e que o aumento da expectativa de vida e a busca pela estética têm conduzido a um maior número desse tratamento em adultos. Conseqüentemente, aumenta-se o risco de pacientes com doenças sistêmicas, decorrentes da idade, presentes nos consultórios ortodônticos, incluindo os pacientes portadores de osteoporose. A necessidade de correções ortodônticas em pacientes com alterações sistêmicas exige novos conhecimentos acerca da influência da força ortodôntica sobre os tecidos periodontais. Clinicamente, a osteoporose pode provocar perda de massa óssea, principalmente nos ossos longos e vértebras, podendo, também, alterar os tecidos ósseo da maxila e da mandíbula, envolvidos na movimentação dentária (BRUDVIK; RYGH, 1994; DAVIDOVITCH, 1991; PEREIRA; TAVEIRA, 2000).

Sabe-se que a movimentação dentária é a base do tratamento ortodôntico. De acordo com Moyers (1991), o aparelho ortodôntico é um sistema que armazena e libera força sobre dentes, músculos ou ossos, criando uma reação dentro do ligamento periodontal e no osso alveolar, provocando movimento dentário, alterando a morfologia óssea ou seu crescimento. Essa força exercida sobre os dentes é imediatamente transmitida ao ligamento periodontal, e através de seus feixes de fibras, ao osso de suporte, formando áreas de pressão e tração no periodonto de sustentação, desencadeando, assim, o movimento dentário (MOYERS; BAUER, 1950; GIANELLY; GOLDMAN, 2008).

O resultado biológico após a aplicação da força ortodôntica sobre o dente é sempre o mesmo: reabsorção óssea do lado de pressão e neoformação óssea do lado de tração do ligamento periodontal. O processo de remodelação óssea permite que o dente se mova, mantendo a largura fisiológica do espaço periodontal (GIANELLY; GOLDMAN, 2008; BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2010). A base de toda a terapia ortodôntica está, portanto, intimamente relacionada com o processo de remodelação óssea e com o processo inflamatório dentro do espaço do ligamento periodontal.

Alguns medicamentos, administrados de forma sistêmica, podem interferir nos tratamentos ortodônticos, por agirem na osteogênese ou nos elementos do periodonto de inserção (CHOI et al., 2010; KARRAS et al., 2009). Entretanto, a forma como o tecido ósseo responde à aplicação de forças, em casos específicos, como na osteoporose, ainda é pouco compreendida em termos biomoleculares. A análise da qualidade óssea, sob o ponto de vista molecular, poderá contribuir para um melhor entendimento da formação óssea em pacientes osteoporóticos, assim como a identificação molecular de reguladores da reabsorção e formação óssea poderá auxiliar na investigação da fisiopatologia óssea, nas áreas submetidas à movimentação dentária e, em associação aos exames de imagem, caracterizar melhor a qualidade óssea.

Apesar do grande número de relatos na literatura, de estudos que utilizaram a doxiciclina em doses subantimicrobianas (DDS) na periodontia, no controle da remodelação óssea, a investigação sobre esta terapia no tratamento ortodôntico ainda é incipiente. Além disso, há poucas evidências que demonstram se medicamentos utilizados sistemicamente no tratamento de osteopenia e osteoporose interferem na movimentação dentária, haja vista que alteram o metabolismo ósseo (CHOI et al., 2010; KARRAS et al., 2009; SALAZAR et al., 2011).

Devido à necessidade de tratamento ortodôntico em pacientes com alterações sistêmicas, como a osteoporose, optou-se por realizar este estudo utilizando a doxiciclina (DOX), em doses subantimicrobianas, na tentativa de reduzir os efeitos deletérios da osteoporose sobre a reparação óssea alveolar, visando a aceleração do processo de remodelamento ósseo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

A qualidade óssea é determinada pela taxa de remodelação do osso, mantendo, assim, sua integridade mecânica e a homeostase do cálcio no organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; MARTIN; CORREA, 2010). A remodelação óssea se inicia com a reabsorção osteoclástica, sendo essa uma atividade erosiva que cria lacunas de 60µm em indivíduos jovens e 40µm em indivíduos mais velhos. A reabsorção tem uma média de 35 dias de duração, enquanto a formação óssea ocorre, em média, em 150 dias (ERIKSEN; GUNDERSEN et al., 1984; ERIKSEN; MELSEN; MOSEKILDE, 1984). Uma remodelação acelerada leva a uma redução irreversível da estrutura trabecular, resultando em um osso mais frágil e aumentando o risco de fraturas.

A osteoporose é um distúrbio clássico inerente à idade, responsável pelo aumento do risco de fraturas ósseas (RIGGS; MELTON, 1986). A fratura osteoporótica é reconhecida como um importante problema de saúde social; provoca um aumento nas taxas de morbidade e mortalidade dos pacientes e, com isso, aumenta os custos de saúde pública (BANDEIRA; CARVALHO, 2007; SVENSSON et al., 2016). Estima-se que, nos Estados Unidos, cerca de 7 a 12 milhões de americanos convivam com a osteoporose (LOOKER et al., 2017). No Brasil, a prevalência dessa doença em mulheres na pós-menopausa varia de 15% a 33% (BACCARO et al., 2015).

Sabendo-se disso, criou-se os modelos animais para indução à osteopenia. Um desses modelos é a ovariectomia, que induz mimeticamente a menopausa, caracterizada pela atividade osteoclástica exceder a atividade osteoblástica, induzindo à osteoporose (TEITELBAUM, 2000). Assim sendo, este modelo animal é utilizado em várias pesquisas, para este fim (JEE; YAO, 2001). Vários estudos empregaram essa metodologia para indução de osteopenia – no modelo animal de ratas Wistar – apresentando resultados relevantes para a prática em pesquisas (ISSA et al., 2015; MACEDO et al., 2017; MONTEIRO et al., 2016; SHIMANO; VOLPON; LIMA, 2008; SHIMANO et al., 2014).

Recentemente, opções de tratamento farmacológico, incluindo agentes antirreabsortivos ou anabólicos, têm sido continuamente desenvolvidas (BYUN et al., 2017). Os bisfosfonatos foram introduzidos na década de 1990, inicialmente com o

etidronato, e, atualmente, continuam sendo o pilar do tratamento das doenças osteoporóticas, baseados na segurança e eficácia (RUSSEL et al., 2008).

Em 1995, a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o uso do alendronato de sódio para prevenção de fratura óssea em mulheres no período pós-menopausa, após o primeiro grande ensaio realizado em pacientes com osteoporose, em que se observou redução de fraturas vertebrais e de outros tipos de fraturas clínicas nas mulheres que fizeram uso da medicação (BLACK et al., 1996).

Os bisfosfonatos são análogos estáveis do pirofosfato e possuem alta afinidade pela hidroxiapatita óssea. Em virtude dos seus efeitos farmacológicos sobre o osso, apresentam um papel importante nos distúrbios esqueléticos com taxas desequilibradas de remodelação óssea. Tais medicamentos são considerados eficazes no tratamento das doenças que afetam o metabolismo ósseo, caracterizadas pelo aumento da reabsorção, como a osteoporose, doença de Paget, mieloma múltiplo e metástases ósseas (FREITAS et al., 2016). Entre os representantes dos bisfosfonatos, encontra-se o alendronato de sódio (SHIMA et al., 2017; OHNO et al., 2011).

Apesar dos benefícios para o tratamento dessas doenças, em 2003 foi relatado o primeiro caso de osteonecrose dos maxilares relacionada ao uso de bisfosfonatos (MARX, 2003). Aproximadamente 95% dos casos de osteonecrose ocorrem em pacientes com câncer que recebem altas doses de bisfosfonatos, enquanto apenas 5% dos casos são em pacientes com osteoporose que recebem baixas doses da terapia, demonstrando, desse modo, a relação entre a dose aplicada e o desenvolvimento da osteonecrose (FAVUS, 2007; COMPSTON, 2011). Embora diversos estudos relatem a influência dessas medicações na movimentação ortodôntica, ainda não existem pesquisas que comprovem que o tratamento ortodôntico aumenta o risco à osteonecrose (SIRISOONTORN et al., 2012; KAIPATUR et al., 2013; HASHIMOTO et al., 2013; VENKATARAMANA et al., 2014; CONSOLARO, 2014; SALAZAR et al., 2015; NAKAS et al., 2017; FRANZONI et al., 2017).

Durante a movimentação ortodôntica, a aplicação de uma força mecânica leva a um movimento dentário caracterizado por mudanças na remodelação de tecidos periodontais. Esses tecidos, quando expostos a variados graus de

magnitude, frequência e duração da força, expressam alterações macroscópicas e microscópicas (KRISHNAN; DAVIDOVITH, 2006). Ren et al. (2004) demonstraram, em sua revisão sistemática, que os ratos são um bom modelo animal para estudos com movimentação ortodôntica, considerando-se aspectos como: custo, amostra em estudo, tempo de manutenção e análises microscópicas.

Em relação aos bisfosfonatos, estudos relacionam este medicamento ao movimento dentário ortodôntico (FUJIMURA et al., 2009; KARRAS et al., 2009; CHOI et al., 2010; SIRISOONTORN et al., 2012; VENKATARAMANA et al., 2013; KAIPATUR et al., 2013; HASHIMOTO et al., 2013; SALAZAR et al., 2015; NAKAS et al., 2017; FRANZONI et al., 2017). Outros estudos observaram que este medicamento reduziu a taxa de movimentação ortodôntica, o número de osteoclastos e a reabsorção radicular (CHOI et al., 2010; SIRISOONTORN et al., 2012) no lado de pressão.

Além dessas pesquisas em animais, também é possível encontrar, na literatura, estudos envolvendo seres humanos, como a revisão sistemática realizada por Krieger et al. (2013). Segundo os autores, devido à falta de evidências científicas, o movimento dentário ortodôntico em pacientes expostos aos bisfosfonatos ainda é imprevisível e os riscos do tratamento devem ser analisados.

Além de induzirem a apoptose, os bisfosfonatos também podem afetar a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos de outras maneiras, como no recrutamento, formação e diferenciação (ROSINI et al., 2015). Podem, também, prevenir fatores ativadores de osteoclastos, tais como a interação do ligante do receptor ativador do fator nuclear-KB (RANKL) ao seu receptor (RANK), mediador primário da diferenciação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos (KRISHNAN; PANDIAN; KUMAR, 2015).

O estudo de Barros Silva et al. (2019) relacionaram o uso de bisfosfonatos a alterações no fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), bem como nos níveis do fator de necrose tumoral α (TNF- α) e de osteoprotegerina (OPG), após infusões intravasculares de 0,20 mg/kg de ácido zolendrônico e de 0,1ml/kg de solução salina, com 0, 7, 14 e 49 dias. Três semanas após a última administração, os animais foram sacrificados para análise imuno-histoquímica e observou-se um aumento nos níveis de OPG no grupo que recebeu a medicação.

Devido ao fato de os bisfosfonatos se incorporarem na matriz óssea e possuírem uma meia-vida extremamente longa, eles ainda podem afetar o metabolismo ósseo por até dez anos após o paciente ter completado a terapia (BARTZELA et al., 2009). Desta forma, a análise de outras medicações para o tratamento da osteoporose se faz necessária, como no caso da doxiciclina. A DOX é um membro da família das tetraciclinas, sendo uma droga utilizada como antibiótico (posologia de 100 mg/dia) e como inibidor de metaloproteinases de matriz, MMPs (posologia de 20 mg, duas vezes ao dia), uso que tem efeitos de droga antiinflamatória. Com esta última indicação, ela é utilizada no tratamento da periodontite crônica (GOLUB et al., 2001) e de inflamações crônicas na pele (TAN et al., 2011). O uso da doxiciclina em DDS foi aprovado em 1998, pela FDA, nos EUA, e uso pode ser feito continuamente, por nove meses. Nesta dosagem, não ocorre o surgimento de resistência microbiana à doxiciclina (THOMAS; WALKER; BRADSHAW, 2000).

As MMPs são as principais proteases responsáveis pela degradação periodontal (GURKAN et al., 2008). A Colagenase-2 (MMP-8) é inibida por doxiciclina e esta MMP é atualmente a mais estudada e diretamente associada com a severidade da doença periodontal (SORSA et al., 2011; SORSA; TJADERHANE; SALO, 2004). Foram comprovados vários efeitos benéficos do uso da doxiciclina em doença periodontal, como coadjuvante à terapia convencional (GOLUB et al., 1995). A doxiciclina também tem um potencial de inibição da degradação da matriz extracelular (NOVAK et al., 2002). Como inibidor de MMPs, trabalhos com a doxiciclina têm demonstrado efeitos benéficos em várias doenças cardiovasculares, particularmente em aneurismas (ABDUL-HUSSIEN et al., 2009), aterosclerose (CASTRO et al., 2008), calcificação de aorta (BOUVET et al., 2008), hipertensão arterial (CASTRO et al., 2008), além da diminuição de biomarcadores de inflamação em mulheres com histórico de doença periodontal.

Como no caso da periodontite e das doenças de pele, a grande vantagem do uso da doxiciclina para as doenças cardiovasculares, com grande envolvimento de MMPs, se refere ao fato de a doxiciclina ser uma droga conhecida desde 1958; portanto, são conhecidos os seus efeitos colaterais. Além desta, outra vantagem é seu baixo custo, especialmente, quando comparado com o preço de novos inibidores enzimáticos, que são extremamente caros e cujos efeitos colaterais ainda não descritos.

3. PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

No presente estudo, objetivou-se avaliar e comparar *in vivo* o efeito do medicamento doxiciclina, em dose subantimicrobiana (SDD) de 30 mg/kg/dia, com o alendronato de sódio, sobre o processo de remodelação óssea que ocorre em ratas osteopênicas, após a aplicação de força ortodôntica.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente estudo foram:

1. Avaliar a variação de massa corpórea dos animais ao final do experimento, nos grupos analisados;
2. Avaliar a taxa de movimentação dentária, por meio da histomorfometria;
3. Avaliar, quantitativamente, o osso na região de furca dos molares superiores, a partir do parâmetro de volume ósseo, por meio da avaliação histomorfométrica;
4. Avaliar a remodelação óssea, através da quantificação e expressão dos genes *Tnfrsf11a* (RANK), *Tnfsf11* (RANKL), *Tnfrsf11b* (OPG), por meio do PCR-RT.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo de caráter experimental laboratorial *in vivo*, do tipo quantitativo.

4.2 Cálculo amostral

O cálculo amostral foi obtido através do Programa G Power 3.1 (Düsseldorf, Germany), para determinar a diferença entre duas médias independentes (dois grupos), usando teste “t”. Esses cálculos foram obtidos a partir de dados de um estudo piloto, para avaliar os efeitos de quatro marcadores utilizados na presente investigação. Os parâmetros utilizados para estimar o tamanho da amostra foram: erro α (erro de probabilidade) = 0,05; erro β (1 - β erro de probabilidade) = 0,8; tamanho do efeito = 0,8116; número de grupos = 24 (12 grupos, de acordo com a intervenção recebida, analisados em dois momentos diferentes). O cálculo final, em um tamanho de amostra total, foi de 72 (três animais por grupo). Devido à possibilidade de perda de animais, esse tamanho foi aumentado em um animal por grupo, resultando em uma amostra total de 96 (quatro animais por grupo).

4.3 Delineamento experimental

Os procedimentos desta pesquisa obedeceram às recomendações éticas e legais especificadas para experimentação animal do Manual aprovadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), de 1991, e às recomendações legais conforme Lei n.º 6.638, de 08 de maio de 1979, publicada no Diário Oficial da União. Também foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo – Faculdade de Odontologia do Campus de Ribeirão Preto (Protocolo 0070/2023). Os animais foram alimentados com dieta padrão, constituída por ração (Labina – Purina) e água *ad libitum*, e permaneceram em gaiolas com dimensões de 41x34x16cm, sendo que cada gaiola tinha um número

máximo de três animais. O foto-período foi controlado com intervalos de dia-noite de 12 horas, para evitar alterações no ciclo metabólico, e a temperatura da sala do biotério manteve-se entre 21°C e 23°C, ideal para o crescimento e desenvolvimento dos animais. O local foi mantido constantemente arejado e limpo.

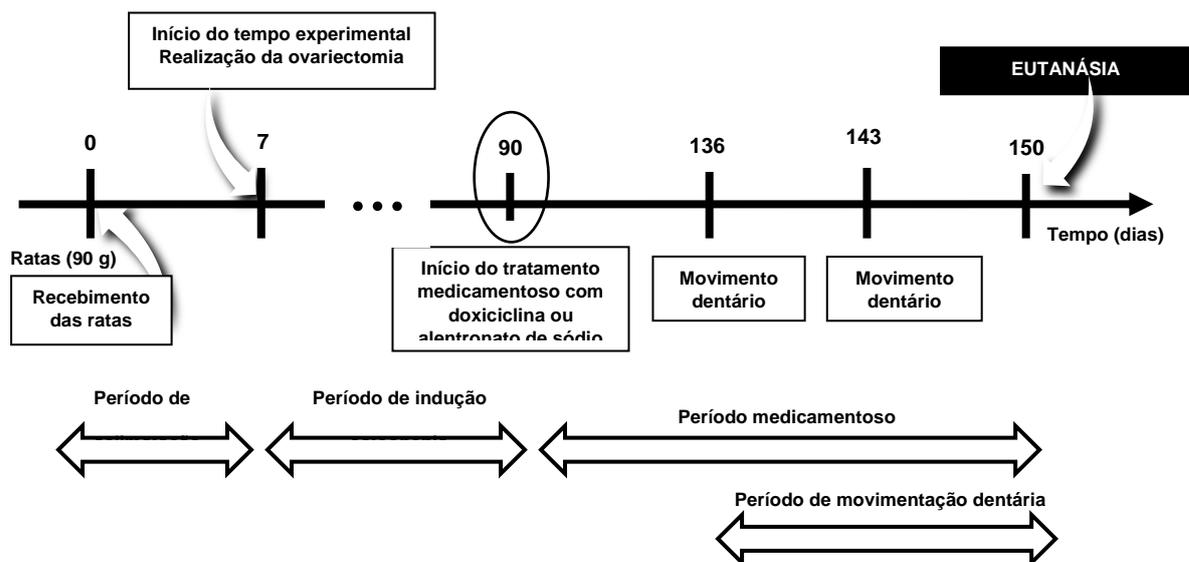
Foram utilizadas 96 ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus, albinus*), com 25 dias de vida (jovens em desenvolvimento), pesando, em média, 90g, no início do experimento. As ratas foram fornecidas pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto – e transferidas para o Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), onde foram mantidas. As ratas foram pesadas e, posteriormente, distribuídas aleatoriamente (Tabela 1) em seis grupos (n=8 em cada grupo), definidos da seguinte maneira: **SHAM** (Controle Negativo); **DOX** (exposto à doxiciclina 30 mg/kg/dia); **ALN** (exposto ao alendronato de sódio 0,7 mg/kg/semana); **OVX** (Ovariectomizado); **OVX+DOX** (Ovariectomizado exposto à doxiciclina 30 mg/kg/dia); **OVX+ALN** (Ovariectomizado exposto ao alendronato de sódio 0,7 mg/kg/semana). Todos os animais tiveram o primeiro molar superior direito movimentado ortodonticamente, sendo os mesmos analisados em dois períodos experimentais (7 e 14 dias).

Tabela 1: Grupos experimentais, tempos, número de animais e procedimentos propostos.

GRUPOS	N.º DE ANIMAIS (unidades)				DESCRIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS
	Tempo Experimental (dias)				
	7 dias		14 dias		
	PCR	Histológico Imunohistoquímica	PCR	Histológico Imunohistoquímica	
Grupo Sham	4	4	4	4	Grupo Controle Negativo
Grupo DOX	4	4	4	4	Grupo exposto à doxiciclina 30mg/Kg/dia
Grupo ALN	4	4	4	4	Grupo exposto ao alendronato de sódio 0,7 mg/Kg/semana
Grupo OVX	4	4	4	4	Grupo Controle Ovariectomizado
Grupo OVX+DOX	4	4	4	4	Grupo Ovariectomizado exposto à doxiciclina 30 mg/Kg/dia
Grupo OVX+ALN	4	4	4	4	Grupo Ovariectomizado exposto alendronato de sódio 0,7 mg/Kg/semana
TOTAL	96 animais				Total de animais distribuídos nos diferentes grupos experimentais

Os procedimentos experimentais dos grupos foram iniciados com 80 dias de vida dos animais, uma vez que as fêmeas alcançam a maturidade sexual com esta idade e sabe-se que a maturidade óssea é adquirida somente com 10 meses de idade (ou 300 dias de vida) (JEE; YAO, 2001). As ratas foram submetidas à indução de osteopenia/osteoporose por 90 dias (Diagrama 1). Posteriormente, foi iniciado o tratamento medicamentoso por 60 dias, com Doxiciclina, na concentração de 30 mg/kg/dia, e alendronato de sódio, na concentração de 0,7 mg/kg/semana, para os grupos expostos ao medicamento. 14 e 7 dias antes da eutanásia, foram montados os dispositivos para a movimentação dentária nos primeiros molares superiores (direito). Os procedimentos experimentais estão descritos no diagrama a seguir (Diagrama Experimental 1).

Diagrama Experimental 1: Cronologia dos procedimentos experimentais



4.4 Manipulação da amostra

4.4.1 Anestesia nos animais

A realização dos procedimentos de laparotomia bilateral, remoção dos ovários e montagem dos aparelhos foi feita sob anestesia, utilizando solução de Cloridrato de Ketamina (anestésico) 70mg/Kg (Dopalen, Sespo Ind. e Com. Ltda., Jacareí, SP, Brasil) associado com a solução de Cloridrato de Xilazina (relaxante

muscular), 8mg/Kg (Dopaser, Anasedan AgribRANDS do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brasil), via intramuscular.

4.4.2 Procedimento de ovariectomia

Os procedimentos operatórios foram realizados na sala de cirurgia experimental do Biotério I, da FORP-USP, sob condições adequadas de limpeza, anti-sepsia e desinfecção, com instrumentos esterilizados em autoclave. Nos grupos submetidos à ovariectomia, os animais foram anestesiados, foi realizada a anti-sepsia com Polivinilpirrolidona iodada (Riodeine Indústria Química e Farmacêutica Rioquímica, Brasil, Ltda.), seguido de tricotomia entre o rebordo costal inferior e o início da pelve e, posteriormente, submetidos à antissepsia da área, acesso cirúrgico e divulsão do tecido.

Em seguida, realizou-se a evisceração do corno ovariano e ligadura, para que não houvesse sangramento pós-operatório. O mesmo procedimento foi realizado no lado oposto, para que houvesse a excisão de ambos os ovários (SHIMANO; VOLPON; LIMA, 2008; DE VASCONCELLOS et al., 2014). Após a cirurgia, os animais receberam aplicação de pentabiótico (Zoetis, Parsippany-Troy Hills, Nova Jersey, EUA), em dose única. Os animais do grupo controle foram submetidos à cirurgia *Sham*, que é a realização do procedimento cirúrgico sem que ocorra a remoção dos ovários. A osteopenia ocorreu 90 dias após o procedimento cirúrgico (WRONSKI; CINTRON; DANN, 1988; WRONSKI et al., 1989).

4.4.3 Administração de Alendronato

O Alendronato de sódio foi obtido a partir de uma substância pura (Alendronato de Sódio Tri-hidratado 1%). Este medicamento foi acondicionado na concentração de 10 mg/ml (fração máxima solúvel deste medicamento). Durante 60 dias subsequentes à cirurgia, os animais do grupo ALN e OVX+ALN receberam uma injeção subcutânea de alendronato de sódio uma vez por semana, administrada via subcutânea, no dorso do animal. A dose utilizada para este experimento foi de

0,7mg/kg/semana (VOLPON et al., 2008). O uso dos medicamentos por 60 dias é seguro e este período de vida nos animais é equivalente com um tratamento de dois anos em humanos (QUINN, 2005).

4.4.4 Administração de Doxíciclina

A doxíciclina foi administrada na água de beber, conforme estudo de Issa et al. (2015), por 60 dias e, foi realizada a manutenção de acordo com um gráfico diário do quanto foi ingerido de água em cada caixa. A dose de 30 mg/kg/dia foi baseada em estudos previamente publicados (BRIEST et al., 2003; GUIMARAES et al., 2011; CASTRO et al., 2012; THARAPPEL et al., 2016).

4.4.5 Instalação e ativação do dispositivo ortodôntico para a movimentação dentária

14 e 7 dias antes da eutanásia dos animais (Diagrama Experimental 1), as ratas foram anestesiadas, via intramuscular, com uma associação de cloridrato de xilazina e cloridrato de ketamina, e submetidas à montagem do dispositivo mecânico, para a movimentação dentária. O mecanismo de força escolhido foi constituído de mola de níquel-titânio de secção fechada (Figura 1), semelhante ao apresentado Heller e Nanda (1979), substituindo a mola de aço por níquel-titânio. Isso permitiu a correta calibração e padronização das forças empregadas em todos os animais, produzindo um vetor de mesialização do molar e o movimento palatino dos incisivos.

Depois de anestesiados e posicionados na mesa operatória, os animais receberam dispositivos ortodônticos constituídos de molas espiraladas de Ni-Ti (níquel-titânio) e de secção fechada de 0.006 X 0.022" (Unitek - 341-120), de 7mm de comprimento. Previamente à montagem do dispositivo para a movimentação dentária, foi preparada a superfície dos incisivos superiores, com o objetivo de aumentar a retenção e estabilização da mola na região desses dentes.

Utilizou-se, para isto, uma broca esférica diamantada n.º 1011 (K.G. Sorensen), em motor de alta rotação (Dabi-Atlante), para confeccionar canaletas rasas, apenas no esmalte, transversais ao longo eixo do dente, no terço gengival das faces vestibular e distal dos incisivos superiores. Sabe-se da característica,

entre os roedores, de rápida e contínua erupção dos incisivos, e, para evitar que o aparelho sofresse deformação no período de movimentação dentária, as retenções nos dentes foram feitas de forma mais cervical possível.

Também, para prevenir interferências oclusais com o dispositivo ortodôntico, foram reduzidas as bordas dos incisivos inferiores, com brocas diamantadas cilíndricas n.º 1090 (K.G. Sorensen). A mola, quando distendida (3mm de comprimento), produziu 40gF (REN et al., 2003; GAMEIRO et al., 2008; MAGANZINI et al., 2010), aferida por meio do tensiômetro (ETM Corporation - 1303) devidamente calibrado.

O tamanho final de cada mola, medido com compasso de pontas secas, permitiu a padronização das molas, quando colocadas na cavidade bucal. O posicionamento do dispositivo possibilitou que a mola, quando ativada, promovesse tração no ligamento periodontal do lado distal dos molares e pressão no lado mesial. Esse modelo de movimentação foi realizado na maxila apenas do lado direito, e o lado direito foi utilizado como controle.

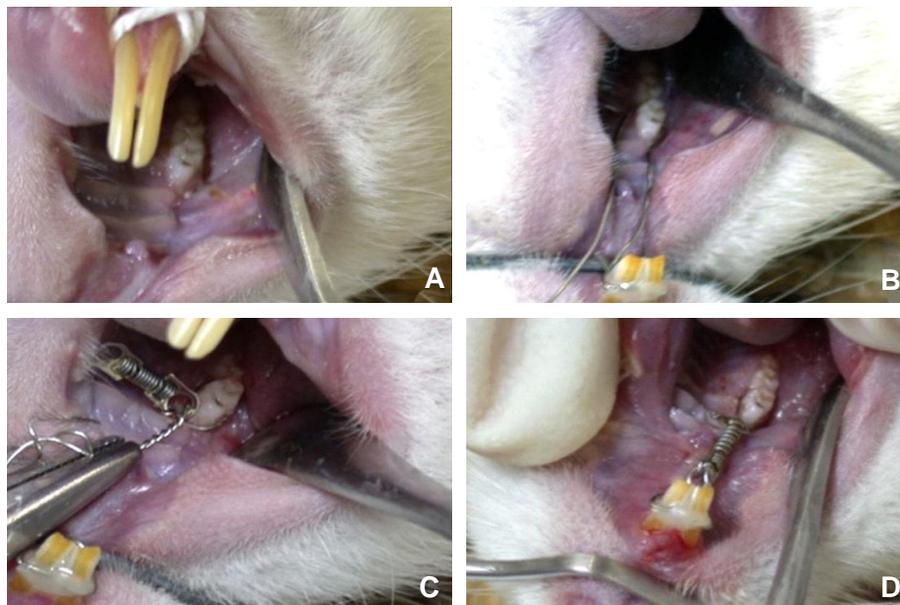


Figura 1: **A:** Fotografia mostrando o primeiro molar superior direito. **B:** Fio de amarrilho adaptado abaixo do ponto de contato entre o primeiro e segundo molar superior. **C:** Mola de Ni-Ti adaptada ao primeiro molar superior. **D:** Mola ativada em posição.

4.4.6 Eutanásia dos animais e coleta dos espécimes para análises

A eutanásia das ratas foi realizada por overdose anestésica composta por administração intramuscular de Ketamina 100mg/kg e Xilazina 10mg/kg, via intramuscular, complementado com inalação gradativa até 40% de CO₂ (AKIN et al., 2004; REN et al., 2004). Previamente ao momento da indução da morte, os pesos das ratas foram devidamente anotados (Tabela 2). Em seguida, os animais dos grupos destinados à avaliação por PCR e análise histológica foram decapitados.

Os espécimes dos grupos destinados ao preparo histológico tiveram as maxilas removidas, dissecadas e imersas em formol 10% (Merck, Darmstadt, Germany), e a hemi-maxila direita contendo o primeiro molar movimentado foi separada da esquerda, ao longo do plano sagital mediano. O primeiro molar superior direito de cada animal foi utilizado como controle da movimentação em todos os grupos, pois não recebeu força ortodôntica. Os espécimes dos grupos que foram analisados por PCR-RT foram armazenados em tubos plásticos livres de RNAses (Eppendorf, São Paulo, Brasil), identificados e conservados em freezer a -80°C, para posterior análise da expressão gênica. Os espécimes destinados para a análise histológica foram conservados em formol tamponado a 10%, por 48 horas e, posteriormente, foi iniciado o processamento histológico.

4.4.7 Processamento Histológico

Após a eutanásia, as peças foram fixadas em formol tamponado a 10%, por 48 horas, em frascos individuais. Na sequência, os espécimes foram lavados em água corrente, por 24 horas, e colocados em solução desmineralizadora à base de EDTA a 10% (etileno-diaminotetra-acético – Merck, Darmstadt, Germany), tamponado em pH neutro (7,0 - 7,4), por um período de quatro semanas. Durante a descalcificação, as peças foram armazenadas individualmente, em frascos esterilizados, contendo quantidade de solução descalcificadora equivalente a 20 vezes o volume da peça. Esta solução foi renovada a cada 72 horas, com o intuito de preservar a matriz orgânica durante o processo de descalcificação. A confirmação da descalcificação das secções anatômicas foi realizada através de radiografias obtidas das peças anatômicas, durante o período de descalcificação, a fim de avaliar o grau de calcificação das peças.

Depois de submetidos à desmineralização, todos os espécimes foram imersos em sulfato de sódio a 5%, por 24h, à temperatura ambiente, com a finalidade de neutralizar a ação da solução descalcificadora. Os espécimes foram lavados em água corrente, por 24h. Posteriormente, foi realizada desidratação em concentrações crescentes de álcoois, 70%, 80%, 90% e 100% (Reagen, PR, Brasil), sucessivamente, por 60 minutos, à temperatura ambiente, a fim de evitar trocas osmóticas bruscas, o que poderia causar alterações nas estruturas teciduais. Concluída a desidratação, as peças foram diafanizadas em três banhos de xilol (Merck, Darmstadt, Germany). O xilol é miscível em álcool e em parafina, isto é, remove todo o álcool das peças anatômicas e fornece ao tecido condições de ser impregnado pela parafina. O tempo de imersão em cada solução de xilol I, II e III dependeu da evolução da diafanização. De modo geral, as peças ficaram em torno de 60 minutos em cada solução.

Após o xilol substituir todo o álcool nas peças, estas foram submetidas à parafinização lenta, promovida por seguidos banhos de xilol-parafina, nas proporções de 2:1, 2:2, e parafina pura (Reagen, PR, Brasil), sendo que as peças ficaram imersas por uma hora em cada banho. Durante esse procedimento, as peças foram mantidas em estufa de temperatura constante, regulada para 58°C, até que o xilol fosse completamente substituído pela parafina fundida. Tão logo a infiltração se completou, as peças foram posicionadas no centro de formas de alumínio com dimensões aproximadas de 30mm de extensão por 15 mm de largura e profundidade, as quais foram preenchidas com parafina fundida, de baixa temperatura de fusão (56-58°C, Reagen, PR, Brasil). Antes da solidificação, cada peça foi posicionada no centro da forma de alumínio com parafina, com o auxílio de uma pinça clínica (Duflex) aquecida. Os blocos de parafina solidificados foram identificados e colocados em água gelada e, em seguida, no refrigerador, para evitar a cristalização. Em seguida, esses blocos foram removidos das formas de alumínio, reduzidos com navalhas apropriada, até permanecerem 5mm de parafina de cada lado da peça de interesse e se alcançar paralelismo ideal para serem seccionados no micrótomo rotativo de precisão (Spencer, Modelo 820).

Secções transversais e longitudinais semi-seriadas foram obtidas em micrótomo com 5µm de espessura. As fitas foram levadas ao cristalizador (Robertshaw, IL, EUA), onde foram distendidas e montadas em lâminas silanizadas

para microscopia (Objektträger – Knittel Gläser, Bielefeld, Alemanha). Posteriormente, estas lâminas foram mantidas em estufa, em posição vertical, por 24 horas, a 40° C, para favorecer a remoção da umidade e aderência do material à lâmina. As lâminas foram divididas em dois grupos, sendo que o primeiro grupo foi corado pela técnica de Hematoxilina e Eosina (H/E), para a análise morfológica; e o segundo grupo, com Tricrômico de Masson (TM), a fim de evidenciar a neoformação óssea e o colágeno existente no tecido conjuntivo mineralizado e não mineralizado.

4.4.7.1 Coloração dos cortes para microscópio de luz

Para que o corte pudesse ser submetido à coloração, foi realizada a desparafinização das lâminas. Para isso, procedeu-se, primeiramente, à eliminação da parafina dos cortes pelo xilol, mergulhando as lâminas em soluções de xilol I, II e III, com duração de 10 minutos em cada solução. Assim que foi constatada a eliminação da parafina dos cortes, iniciou-se o processo de hidratação, quando o xilol foi removido com banhos de álcool absoluto I, II e III, (Reagen), e, em seguida, álcool 95%, por três minutos em cada solução, até chegar à água destilada. Esse procedimento tem a finalidade de evitar fenômenos osmóticos bruscos, os quais produzem retrações e deslocamento do material da lâmina. Os cortes histológicos foram montados em série e corados com hematoxilina e eosina (H/E) e tricrômico de Masson (TM).

Para a coloração por H/E, os cortes hidratados foram submetidos à coloração pôr hematoxilina (Merck, Darmstadt, Germany), por três minutos. Em seguida, realizou-se a lavagem das lâminas em água corrente, até assumirem tom azulado, sendo, então, mergulhadas rapidamente em solução de álcool acetificado (solução de ácido acético glacial diluído em álcool 95%). Nova lavagem foi realizada em água corrente, por dois a cinco minutos, e álcool a 95%. A eosina foi utilizada (Merck, Darmstadt, Germany) por 2,5 minutos, dando aos tecidos uma cor rosada. A seguir, foi realizada nova desidratação, através de três banhos de álcool absoluto I, II e III, por três minutos cada, e três banhos de xilol (Merck, Darmstadt, Germany) I, II e III, também por três minutos cada.

Para a coloração por TM, os cortes hidratados foram submetidos à coloração pôr Alumen de ferro a 5%, dentro da estufa (38°C a 40°C), por 17 min. Em seguida,

realizou-se a lavagem das lâminas em água corrente, seguida por água destilada. Os cortes foram, então, submetidos à coloração por Hematoxilina de Regaud, dentro da estufa (38°C a 40°C), por 15 minutos. Em seguida, realizou-se a lavagem em água destilada, sendo, então, as lâminas mergulhadas rapidamente em solução de álcool 95%, e, em seguida, mergulhadas, também, rapidamente, em solução de álcool pícrico, por 30 segundos.

As lâminas foram, então, submetidas à nova lavagem em água destilada e à Mistura de Ponceau, por 12 minutos. Os cortes foram mergulhados, rapidamente, em água acetificada a 1% (solução de ácido acético glacial diluído em água destilada) e submetidos à solução de Ácido fosfomolibídico a 1%, por 15 minutos. Nova lavagem em água destilada foi realizada e os cortes foram submetidos à solução de Azul de anilina por três minutos, seguida por lavagem rápida, em água acetificada à 1%, submetidas à solução de Ácido fosfomolibídico por dois minutos e, nova lavagem rápida em água acetificada a 1%. A seguir, foi realizada nova desidratação, através de três banhos de álcool absoluto I, II e III, por três minutos em cada, e três banhos de xilol I, II e III, também por três minutos cada. Finalmente, as lâminas foram cobertas com lamínulas montadas com Enterllan (Merck, Darmstadt, Germany).

Terminada a montagem e secagem das lâminas, estas, com os respectivos cortes corados, foram rotuladas; os cortes foram identificados, e, posteriormente, as lâminas foram acondicionadas em caixas apropriadas e armazenadas em ambiente seco e fresco, estando, finalmente, prontas para exame histológico ao microscópio de luz.

As lâminas foram fotografadas e analisadas em microscópio óptico BX41 (Olympus, Tóquio, Japão) com câmera acoplada QColor3 (Olympus Tóquio, Japão), auxiliado por uma Estação de trabalho DELL Precision T3500 (DELL, São Paulo, Brasil) ambos instalados na FORP/USP.

4.4.8 Análise da expressão gênica

Os protocolos utilizados foram seguidos de acordo com Sambrook e Russel (2006), de uso comum na expressão gênica – Reação Quantitativa de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qRT-PCR), a fim de entender e explicar como o

processo de remodelação óssea na região do alvéolo dentário estava sendo regulado geneticamente. Inicialmente, os espécimes foram pesados, para dar sequência às diversas etapas, para posterior avaliação da expressão gênica.

4.4.8.1 Extração do RNA total

As hemi-maxilas armazenadas em freezer a -80°C , para análise da expressão gênica, foram descongeladas à temperatura ambiente (25°C), remanejadas, com pinça universal n.º 317, para tubos de 2 mL estéreis identificados por grupo e período experimental e pesadas. Para extração do RNA total do tecido ósseo do alvéolo dentário, foi adicionado 600 μL de tampão de lise (Lysis Buffer, PureLink® RNA Mini Kit, Invitrogen, Estados Unidos), conforme protocolo do fabricante, seguida da trituração das amostras através de sonicador (Dispensor T10 Basic ULTRA-TURRAX®, IKA, Estados Unidos) em alta rotação, à temperatura ambiente (25°C) e homogeneização em vortex. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 12.000G, por cinco minutos, a 4°C . O sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo novo, ao qual foi adicionado 300 μL de álcool 70% e homogeneizado em vortex. A solução foi transferida para um tubo de coluna estéril contendo uma membrana central em sílica, e este foi submetido à centrifugação novamente, a 12.000G, por 30 segundos, a 4°C . O filtrado contendo proteínas foi coletado em um novo tubo estéril corretamente identificado, liofilizado e armazenado em freezer -80°C para futuras análises. À coluna, foi adicionado 700 μL de tampão de lavagem I (Wash Buffer I, PureLink® RNA Mini Kit, Invitrogen, Estados Unidos), centrifugado a 12.000G, por 30 segundos, à 4°C , descartando-se o filtrado. Repetiu-se essa última etapa por duas vezes, utilizando-se 500 μL de tampão de lavagem II (Wash Buffer II, PureLink® RNA Mini Kit, Invitrogen, Estados Unidos), descartando-se os filtrados.

À coluna contendo a membrana de sílica foi acoplada a um novo tubo coletor, submetido à centrifugação a 12.000G, por dois minutos, a 4°C , para secagem da membrana de sílica. Foram adicionados 40 μL de água livre de enzima RNA (RNase FreeWater, PureLink® RNA Mini Kit, Invitrogen, Estados Unidos) sobre a membrana de sílica, e, então, submetido à centrifugação a 12.000G, por dois

minutos, a 4°C, a coluna contendo a membrada foi, então, descartada e o filtrado obtido no tubo coletor era o RNA total.

O RNA total foi avaliado quanto à concentração e à pureza do RNA, determinadas pela leitura da densidade óptica (absorbância) das soluções de RNA total em nanoespectrofotômetro (ND 100, Nanodrop Technologies, Estados Unidos), nos comprimentos de onda de 230 a 280nm. A relação A230/A260nm foi considerada aceitável se estivesse acima de 2.0, e A260/A280 se estivesse entre 1.8 e 2.0, pois valores nesse intervalo indicam boa qualidade da amostra, em relação à contaminação (SAMBROOK; RUSSELL, 2006).

4.4.8.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

A síntese do cDNA foi obtida a partir do RNA total através da reação de transcrição reversa. As amostras armazenadas em freezer a -80°C foram descongeladas e mantidas em gelo. Novos tubos eppendorfs de 0,1ml foram preparados, com suas respectivas identificações, para transcrição do cDNA.

O cDNA foi sintetizado utilizando-se 2µl de RNA total de cada amostra, por reação de transcrição reversa, utilizando o kit específico (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied BioSystems) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Foi adicionada às amostras a quantidade recomendada pelo fabricante de cada componente do kit, para obtenção de um volume final de 20µl, para a realização da reação de transcrição reversa.

A reação foi realizada em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient, Eppendorf, Itália). As amostras foram colocadas em placas adaptadas para termociclador programado para atingir as condições de ciclagem recomendadas pelo fabricante, a 25°C, por 10 minutos, para ligação do primer ao RNA, seguida de incubação a 37°C, por 120 minutos, para transcrição reversa, utilizando a enzima transcriptase reversa, e posterior incubação a 85°C, por cinco minutos, para inativação da enzima e finalização do processo. Os cDNAs obtidos foram diluídos 10x em água livre de enzima RNA (RNase FreeWater, PureLink® RNA Mini Kit, Invitrogen, Estados Unidos), e posteriormente armazenados em freezer a -20°C, até a realização do qRT-PCR.

4.4.8.3 PCR em tempo real (qRT-PCR)

A reação da polimerase em cadeia tem por objetivo amplificar os cDNAs provenientes das diferentes amostras, obtendo “amplicons” (segmentos de DNA gerados pelo processo de PCR), em escala exponencial.

Os cDNAs dos genes de interesse *Tnfrsf11a* (RANK), *Tnfrsf11* (RANKL) e *Tnfrsf11b* (OPG) e o gene de controle endógeno GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) (BUSTIN, 2000) foram amplificados em aparelho, para PCR em tempo real. As leituras de fluorescência foram realizadas pelo equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA). As amplificações por PCR foram realizadas em duplicatas, utilizando 2 µl de cDNA por reação, e a água livre de enzima RNAase (RNase FreeWater, PureLink® RNA Mini Kit, Invitrogen, Estados Unidos) foi usada como controle negativo e o RNA de uma das amostras foi adicionado aos primers, ao invés de cDNA, para confirmar ausência de DNA genômico para os experimentos da reação de qRT-PCR.

As reações foram preparadas com TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem, Estados Unidos), adicionado aos primers contendo as sondas específicas para os genes alvos, para obtenção de uma solução com volume final de 5µl por poço. As condições de ciclagem térmica foram realizadas de acordo com as recomendações de tempo e temperatura propostas pelo fabricante (um ciclo inicial a 50°C, por dois minutos; ativação da enzima polimerase a 95°C, por 20 segundos; e 40 repetições (ciclos de amplificação) para desnaturação a 95°C, por três segundos, e anelamento e extensão da fita de cDNA a 60°C, por 30 segundos).

4.5 Análises realizadas

4.5.1 Análise do peso

O peso dos animais foi acompanhado durante todo o experimento, realizando as medidas no início, semanalmente, durante a execução, e no dia da eutanásia, para posterior análise estatística.

4.5.2 Taxa de movimentação dentária

Para as análises da taxa de movimentação dentária e quantificação de osso, foram selecionados dois cortes por lâmina, em três lâminas/animal/tempo de movimentação.

Para a medição do diastema (taxa de movimentação dentária) entre o primeiro e segundo molar superior, foram capturadas imagens dos cortes longitudinais, na altura do centro médio da coroa desses dentes, com objetiva de 4x. Após a seleção do corte, a medição foi feita com ferramenta específica do “software” IMAGEJ 1.28u (programa de domínio público desenvolvido por Wayne Rasband NIMH, NIH, U.S.A.), iniciando do ponto mais projetado da face distal do primeiro molar direito até o ponto mais projetado da face mesial do segundo molar direito (Figura 2). A medição foi realizada três vezes, pelo mesmo avaliador previamente calibrado, e a média dos valores foi utilizada para as análises estatísticas. Os resultados são apresentados como média (μm) \pm erro padrão.

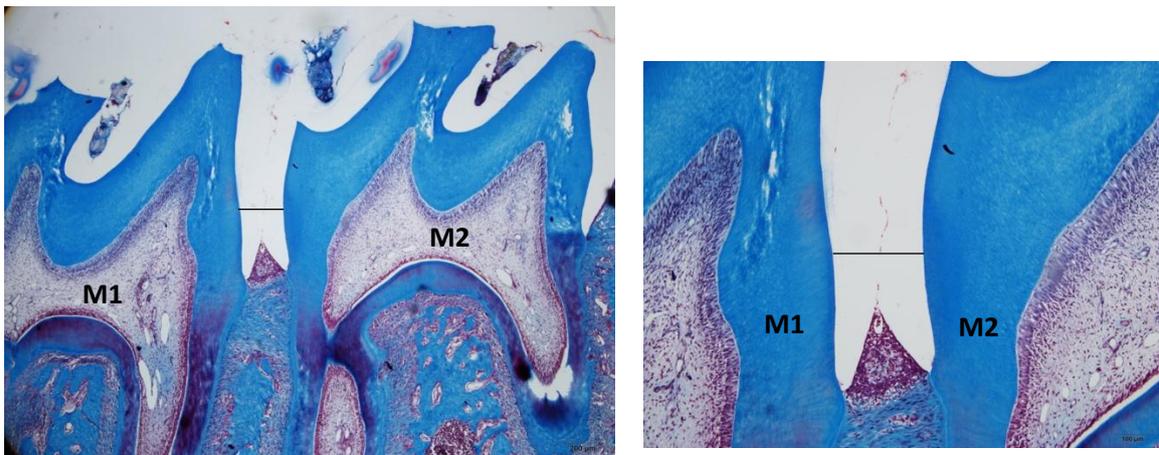


Figura 2: Corte microscópico da região da maxila de rata Wistar, ilustrando o primeiro (M1) e segundo (M2) molares superiores. O traço entre M1 e M2 representa a medida da distância interdentária. Aumento original 4x e 10x. Coloração tricômico de masson.

4.5.3 Porcentagem de osso

A região de furca do primeiro molar foi utilizada para o cálculo dos parâmetros de porcentagem de osso presente. Para esta análise, 10 cortes sagitais foram utilizados; o desenho manual da região de interesse na furca foi realizado respeitando os limites do espaço periodontal e do osso cortical periapical, utilizando

o “software” IMAGEJ 1.28u (programa de domínio público desenvolvido por Wayne Rasband NIMH, NIH,U.S.A.) (Figura 3).

Foram realizadas fotomicrografias, em aumento de 100 X, para visualização da região de furca do primeiro molar superior movimentado e não movimentado. As imagens foram exportadas para o software Image J®, no qual foi utilizado o comando *freehand selections*, para mensuração da área preenchida por tecido ósseo e da área total da região.

Para isto, foi delimitada uma área de tecido ósseo entre a raiz mesial e distal do primeiro molar superior da região da crista alveolar até o terço médio das raízes, contornando-se o osso marginal ao ligamento periodontal (Figura 3). Inicialmente, foi determinada a área total delimitada.

Foi considerada como área total a área ocupada por osso alveolar maxilar, incluindo-se as cavidades ósseas preenchidas por tecido hematopoiético. Finalmente, para a determinação da área ocupada exclusivamente por tecido ósseo, as cavidades ósseas foram medidas, suas áreas foram somadas e o resultado foi subtraído da área óssea total obtida anteriormente.

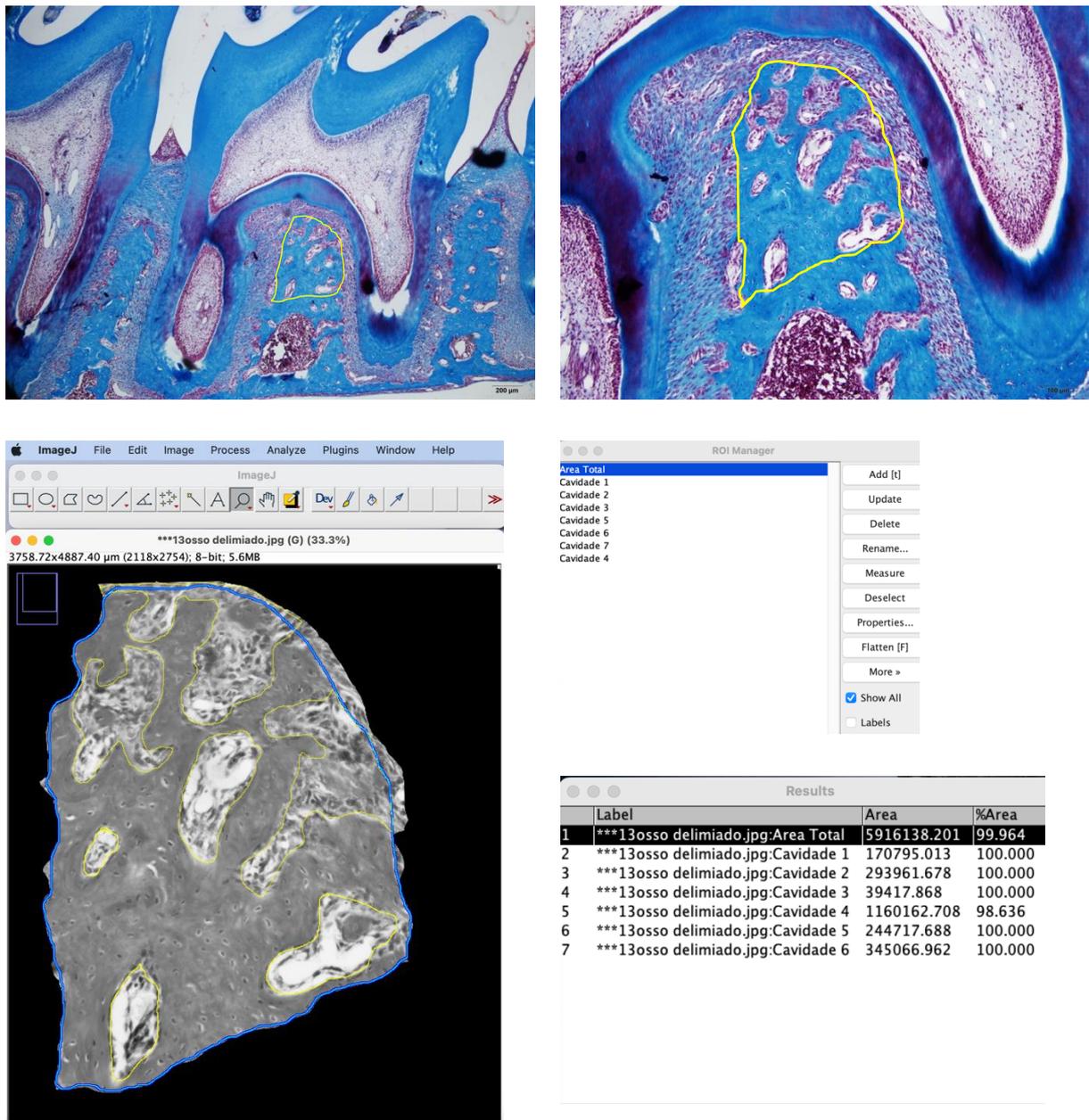


Figura 3: A e B: Corte microscópico do primeiro molar superior. O contorno representa o limite ósseo estabelecido entre as raízes mesial e distal. Aumento original 10x (A) e 20x (B). C: Representação das telas do software Image Pro Plus®, versão 4.5, ilustrando as medidas do osso inter-radicular do primeiro molar superior. Coloração: Tricrômico de Mason.

4.5.4 Expressão gênica

Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar (Ct, Cycle Threshold), sendo este o ponto correspondente ao número do ciclo obtido na fase de amplificação exponencial das amostras que permite a análise quantitativa da

expressão do gene avaliado. Os resultados individuais, expressos em valores de Ct, foram, a seguir, transferidos para planilhas e agrupados de acordo com os diferentes grupos e tempos experimentais, para a realização da análise estatística.

O cálculo de expressão relativa dos genes foi normalizado pela expressão na condição controle, ou seja, pela diferença entre ΔCt das amostras (Ct do gene alvo – Ct do gene endógeno constitutivo) e a média obtida do ΔCt dos animais do grupo controle do período de 7 dias – calibrador, resultando os valores de $\Delta\Delta Ct$ de cada animal. Em seguida, foi realizado o cálculo da expressão de cada gene, avaliado com base na equação (SAMBROOK; RUSSELL, 2006): Expressão relativa = $2^{-\Delta\Delta C}$.

4.6 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão (peso, taxa de movimento dentário, PCR) e em valores percentuais, expressando a proporção da área ocupada por tecido ósseo, em relação à área total. Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way e as diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas usando o teste de Tukey, com nível de significância adotado de 5% ($p < 0,05$). O software estatístico utilizado foi Graph Pad Prism®, versão 9.0 (Graphpad, San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Peso dos animais

Houve aumento da massa corpórea em todos os animais, em todos os grupos analisados, ao final do experimento; entretanto, com diferença estatisticamente significativa entre alguns grupos ($p < 0,001$) (Tabelas 3 e 4).

PESO MÉDIO (GRAMAS) DOS ANIMAIS POR GRUPO

	Início	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias
Sham	153,40 ± 12	293,90 ± 11	335,00 ± 15	363,00 ± 13	402,00 ± 15	348,30 ± 15
DOX	157,00 ± 15	298,40 ± 16	326,00 ± 17	336,00 ± 11	360,00 ± 17	342,90 ± 13
ALN	157,10 ± 14	291,70 ± 13	332,00 ± 13	356,00 ± 15	364,00 ± 12	363,60 ± 17
OVX	154,30 ± 15	351,00 ± 11	396,00 ± 14	460,00 ± 13	460,00 ± 16	438,60 ± 14
OVX+DOX	149,30 ± 12	360,60 ± 14	410,00 ± 11	483,00 ± 15	524,00 ± 18	492,90 ± 12
OVX+ALN	152,00 ± 11	356,10 ± 15	392,00 ± 15	424,00 ± 13	444,00 ± 12	423,30 ± 16

Tabela 2: Comparação do peso médio (gramas) ± desvio padrão, entre grupos de tratamento, comparando-se os grupos de indução medicamentosas com suas respectivas doses ($p < 0,05$).
Legenda: Média (Desvio padrão).

	SHAM	DOX	ALN	OVX	OVX+DOX	OVX+ALN	Valor de p
Tabela 1	348,3 (38,17)	342,9 (13,8)	363,6 (34,8)	434,3 (22,25)	478,6 (68,66)	423,3 (61,13)	a $p < 0,02$
Tabela 2	348,3 (38,17)a,b	342,9 (13,8)b	363,6 (34,8)b	434,3 (22,25)a	478,6 (68,66)a,b	423,3 (61,13)a	b $p < 0,0001$

Tabela 3: Comparação do peso médio (gramas) ± desvio padrão, entre grupos individualmente, demonstrando as diferenças individuais ($p < 0,05$). Legenda: Média (Desvio padrão).

OVX + ALN

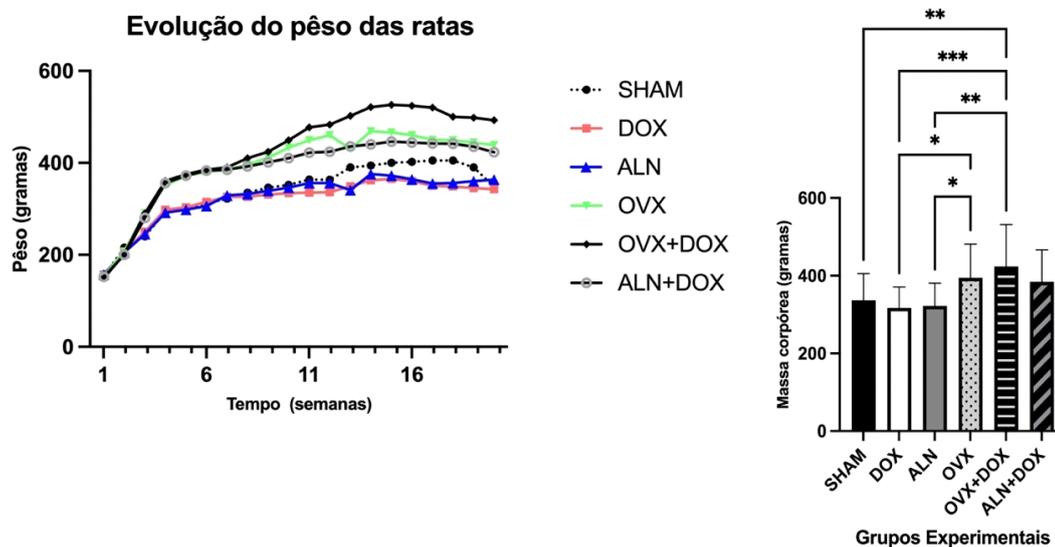


Figura 4: **A:** Evolução da massa corpórea das ratas, nos diferentes grupos, de acordo o tempo analisado (semanas). **B:** Gráfico da média e desvio padrão, da massa corpórea das ratas, nos diferentes grupos analisados durante o experimento. ANOVA, pós-teste Tukey ($p < 0.001$).

5.2 Taxa de movimentação dentária

A Tabela 4, a seguir, representa a distância média entre o primeiro e segundo molar dos cinco grupos estudados, quando comparado com o grupo Sham, nos dois tempos analisados (7 e 14 dias após a aplicação da força ortodôntica). Em todos os grupos, observou-se um maior grau de movimentação, após 14 dias, em comparação ao período de 7 dias ($P < 0.05$). Entretanto, no grupo ovariectomizado, observou-se um maior grau de movimentação, em relação aos demais, sendo essa diferença estatisticamente significativa aos 7 e 14 dias. Para comparação entre os grupos, considerou-se, inicialmente, a existência de ponto de contato entre os primeiros e segundos molares no lado movimentado.

	SHAM	DOX	ALN	OVX	OVX+DOX	OVX+ALN	Valor de p
Inicial	237 ± 22	232 ± 17	236 ± 17*	233 ± 16**	236 ± 19	235 ± 17	* p 0,05
7 dias	398 ± 41	356 ± 28	309 ± 29	512 ± 68	405 ± 28	383 ± 45	**p 0,001
14 dias	583 ± 32	433 ± 31	396 ± 37	593 ± 28***	504 ± 35**	458 ± 32	***p 0,0001

Tabela 4: Distância média (μm) \pm desvio padrão entre o primeiro e o segundo molar superior nos grupos controle (Sham), ovariectomizado (OVX), tratados com alendronato de sódio (ALN), com doxiciclina (DOX), ovariectomizado tratado com alendronato de sódio (OVX+ALN), ovariectomizado tratado com doxiciclina (OVX+DOX), com movimentação dentária por 7 e 14 dias, comparado com o dia 0. *p<0,05, ** p<0,001, *** p<0,0001. ANOVA, pós-teste Tukey.

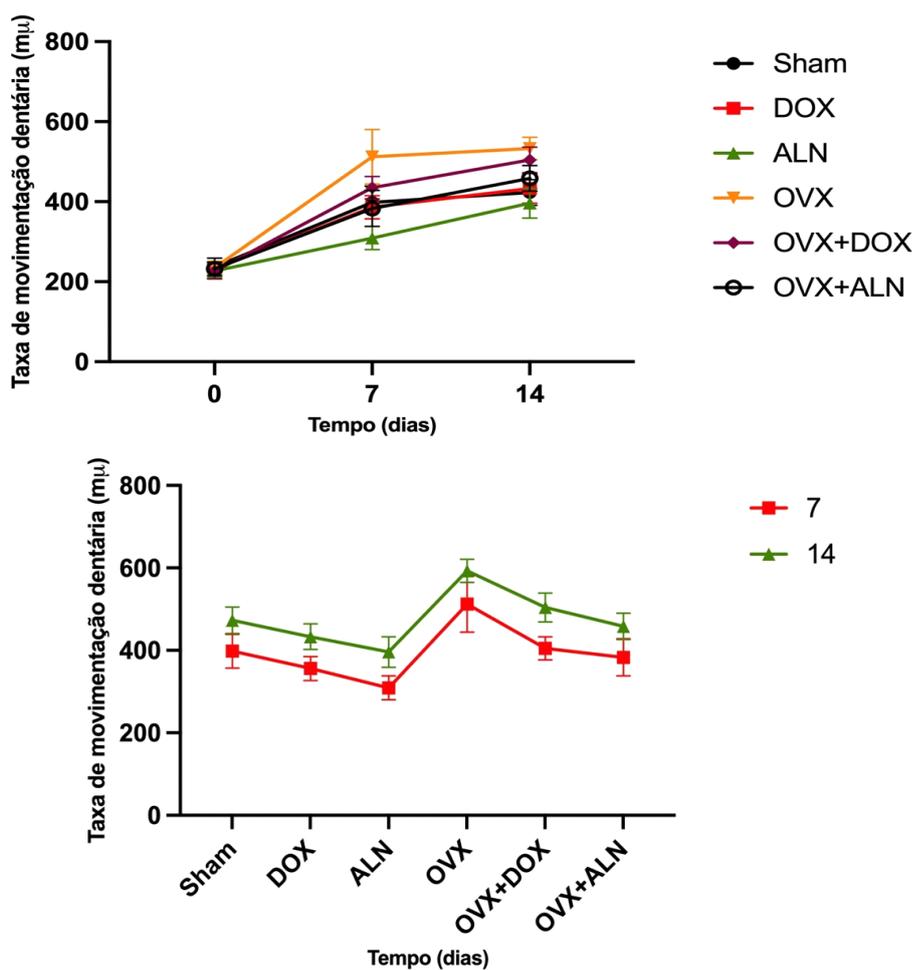


Figura 5: Evolução da taxa de movimentação dentária nos diferentes grupos analisados, durante o período experimental de 14 dias.

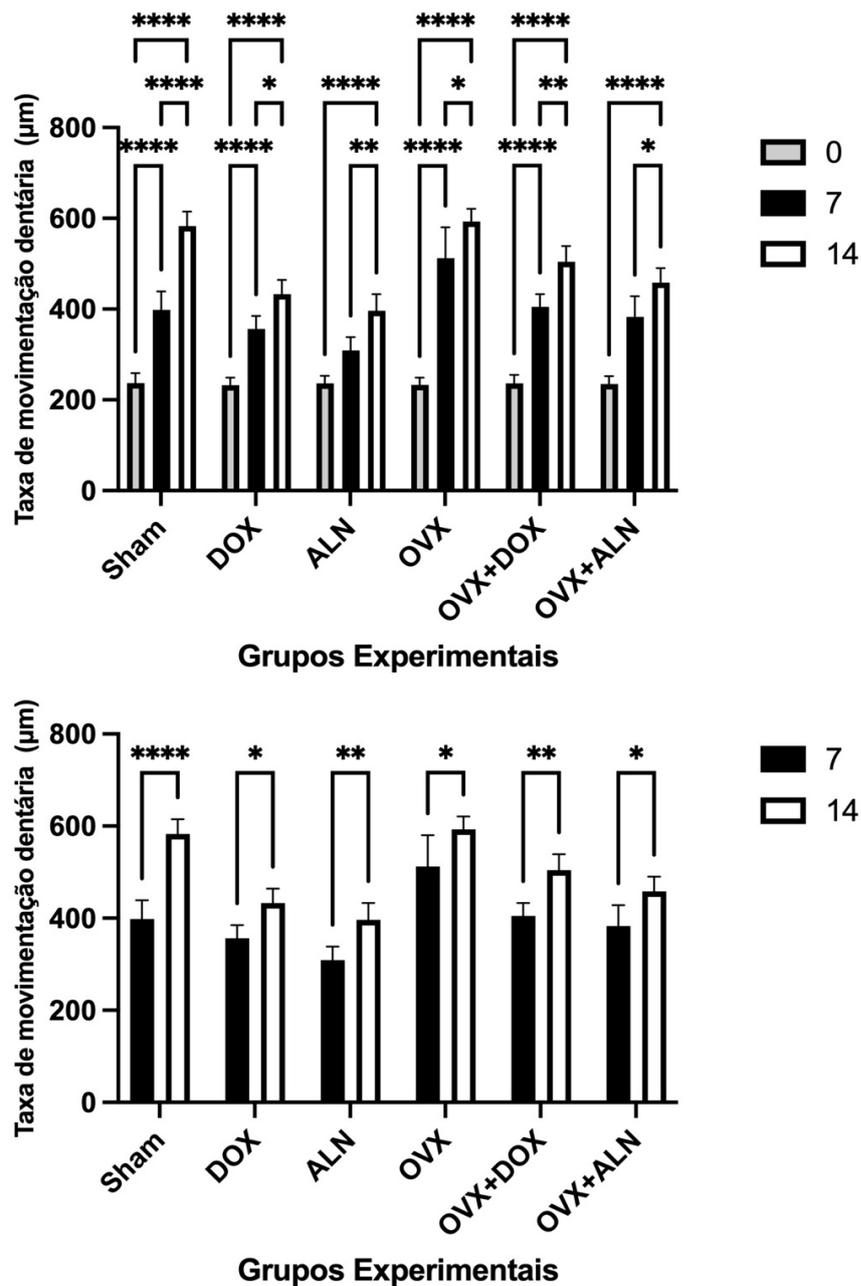


Figura 6: Distância média (μm) \pm desvio padrão entre o primeiro e o segundo molar superior nos grupos controle (Sham), ovariectomizado (OVX), tratados com alendronato de sódio (ALN), com doxiciclina (DOX), ovariectomizado tratados com alendronato de sódio (OVX+ALN), ovariectomizado tratados com doxiciclina (OVX+DOX), com movimentação dentária por 7 e 14 dias, comparado com o dia 0. Aumento significativo da distância para o grupo OVX e OVX+DOX, em relação aos demais grupos, após 7 e 14 dias. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. ANOVA, pós-teste Tukey.

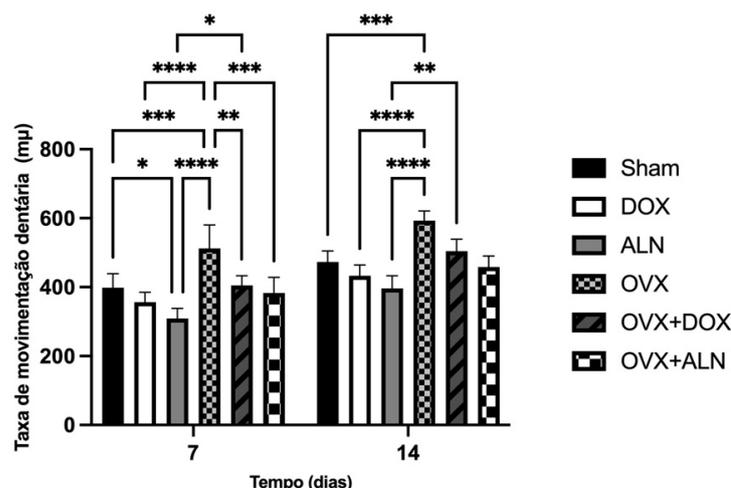


Figura 7: Distância média (μm) \pm desvio padrão entre o primeiro e o segundo molar superior nos grupos controle (Sham), ovariectomizado (OVX), tratados com alendronato de sódio (ALN), com doxiciclina (DOX), ovariectomizado tratados com alendronato de sódio (OVX+ALN), ovariectomizado tratados com doxiciclina (OVX+DOX), com movimentação dentária por 7 e 14 dias, comparado com o dia 0. Aumento significativo da distância para o grupo OVX e OVX+DOX, em relação aos demais grupos, após 7 e 14 dias. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. ANOVA, pós-teste Tukey.

As Figuras 5 a 7 e a Tabela 4 apresentam os resultados referentes à taxa de movimentação dentária. Nos períodos analisados, observou-se uma maior taxa de movimentação dentária no grupo ovariectomizado (OVX), sendo esta diferença estatisticamente significativa, em relação aos outros grupos, e em relação aos períodos inicial e 7 dias. Os grupos OVX+DOX e OVX+ALN também apresentaram maior taxa de movimentação dentária quando comparados com os seus grupos controles e ao SHAM, sendo também, estatisticamente significativos. Quando analisou-se o tempo de observação, todos os grupos tiveram uma maior taxa de movimentação, significativa estatisticamente, no período final de observação.

5.3 Porcentagem de osso inter-radicular

	SHAM	DOX	ALN	OVX	OVX+DOX	OVX+ALN	Valor de p
Inicial	84,6 \pm 2,4	83,4 \pm 3,1	95,3 \pm 2,9***	72,7 \pm 0,6***	79,5 \pm 1,2	80,03 \pm 1,7	* $p < 0,05$
7 dias	85,4 \pm 1,8	81,0 \pm 3,6	87,4 \pm 3,6	61,8 \pm 1,7***	76,6 \pm 1,9***	79,7 \pm 2,8***	** $p < 0,001$
14 dias	81,3 \pm 3,5	84,5 \pm 1,9	93,1 \pm 1,9***	63,6 \pm 2,6***	78,2 \pm 2,3	86,6 \pm 1,4	*** $p < 0,0001$

Tabela 5: Porcentagem média \pm desvio padrão de osso inter-radicular do primeiro molar superior grupos ovariectomizado (OVX), tratados com alendronato de sódio (ALN), com doxiciclina (DOX), ovariectomizado tratados com alendronato de sódio (OVX+ALN), ovariectomizado tratados com doxiciclina (OVX+DOX), com movimentação dentária por 7 e 14 dias, comparado com o controle (Sham). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. ANOVA, pós-teste Tukey.

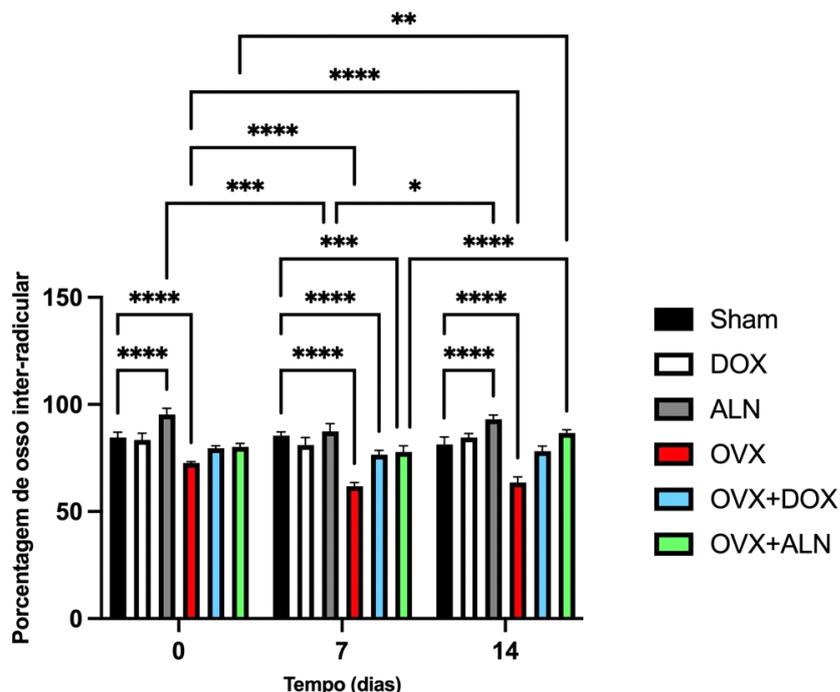


Figura 8: Porcentagem média \pm desvio padrão de osso inter-radicular do primeiro molar superior grupos ovariectomizado (OVX), tratados com alendronato de sódio (ALN), com doxiciclina (DOX), ovariectomizado tratados com alendronato de sódio (OVX+ALN), ovariectomizado tratados com doxiciclina (OVX+DOX), com movimentação dentária por 7 e 14 dias, comparado com o controle (Sham). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. ANOVA, pós-teste Tukey.

A Tabela 5 e as Figuras 8 e 9 apresentam os resultados referentes à porcentagem de osso inter-radicular, comparados com o grupo SHAM. No período sem movimentação, observou-se uma maior porcentagem de osso no grupo ALN, seguido pelo SHAM, e uma menor no grupo ovariectomizado, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Após 7 dias de movimentação, houve uma diminuição na porcentagem óssea, em relação ao período sem movimentação, em todos os grupos analisados, sendo que, nos grupos que sofreram ovariectomia (OVX, OVX+DOX e OVX+ALN), esta redução foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). No período de 14 dias, a porcentagem de osso voltou a subir, em todos os grupos, sendo esse aumento mais expressivo nos grupos tratados com ALN e DOX, e menor no grupo ovariectomizado.

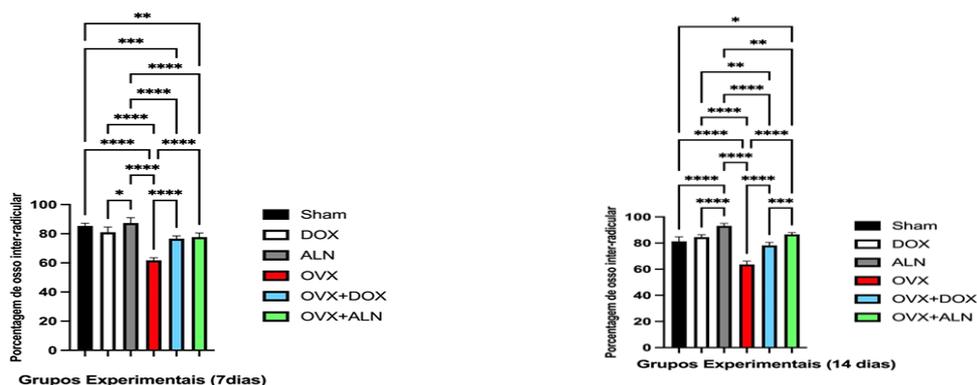


Figura 9: Porcentagem média \pm desvio padrão de osso inter-radicular do primeiro molar superior grupos ovariectomizado (OVX), tratados com alendronato de sódio (ALN), com doxiciclina (DOX), ovariectomizado tratados com alendronato de sódio (OVX+ALN), ovariectomizado tratados com doxiciclina (OVX+DOX), com movimentação dentária por 7 e 14 dias, comparado com o controle (Sham). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. ANOVA, pós-teste Tukey.

Assim, o modelo experimental de osteoporose foi confirmado, uma vez que houve aumento da perda óssea durante os períodos de 7 e 14 dias após a movimentação dentária ortodôntica, nos grupos ovariectomizados (Figura 10). A terapia com doxiciclina submicrobiana reduziu a área total de perda óssea na bifurcação do primeiro molar, quando comparada com o grupo SHAM ($p < 0,0001$).

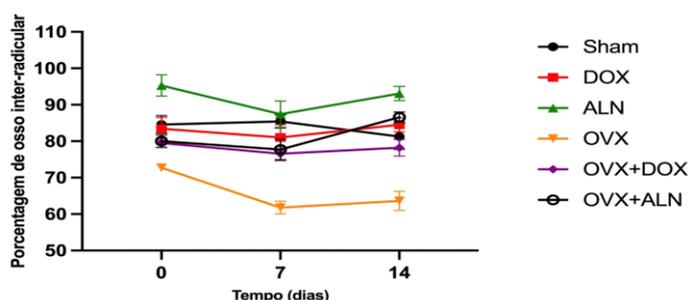


Figura 10: Evolução da porcentagem de osso inter-radicular nos diferentes grupos analisados, durante o período experimental de 14 dias.

5.4 Expressão gênica

Os dados de expressão gênica no tecido ósseo após a aplicação da força ortodôntica e o controle são apresentados em relação aos valores de GAPDH. A administração sistêmica de DOX e ALN e a ovariectomia afetou os níveis de expressão de mRNA, nos três genes analisados, em RT-PCR ($p < 0,001$).

5.4.1 OPG

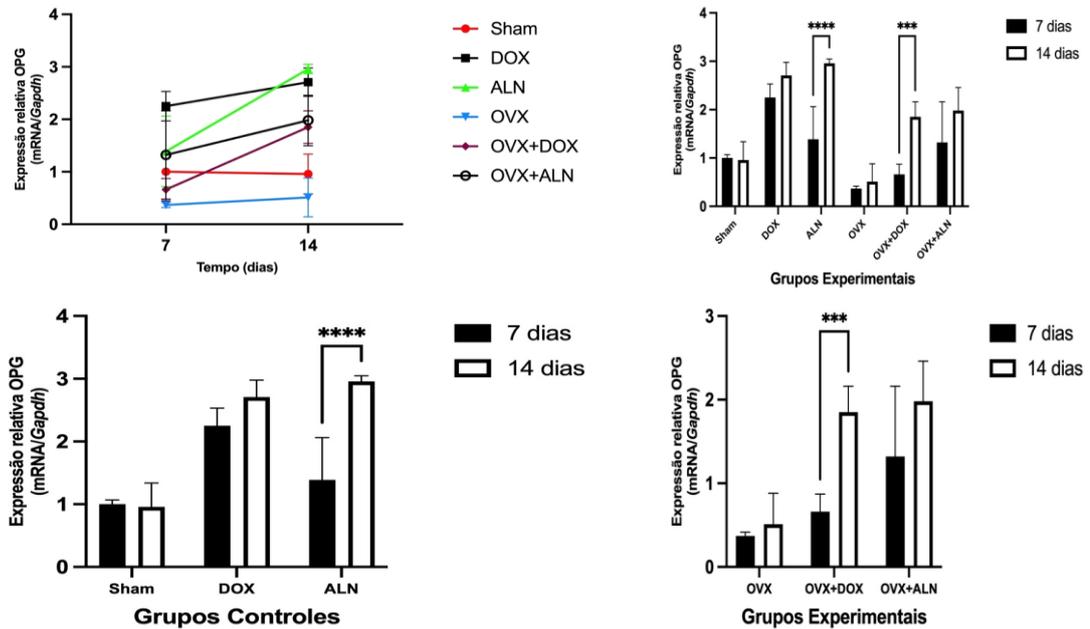


Figura 11: Comparação intra-grupo. Foram calculados os efeitos da dose subantimicrobiana de doxiciclina (DOX) sobre a expressão de OPG níveis de mRNA monitorados em tecido ósseo, apresentados pela proporção: nível de expressão de mRNA/GAPDH.mRNA (razão de produtos de PCR para o gene alvo/GAPDH medido em PCR-RT). Os dados representam a média e desvio padrão (DP). Os dados foram coletados das amostras isoladas do tecido ósseo de 1) SHAM, 2) doxiciclina (DOX), 3) alendronato (ALN), 4) ovariectomizado (OVX), 5) ovariectomizado + doxiciclina (OVX+DOX), 6) ovariectomizado + alendronato (OVX+ALN); no dia-7 e no dia-14. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA, seguida do teste de Tukey).

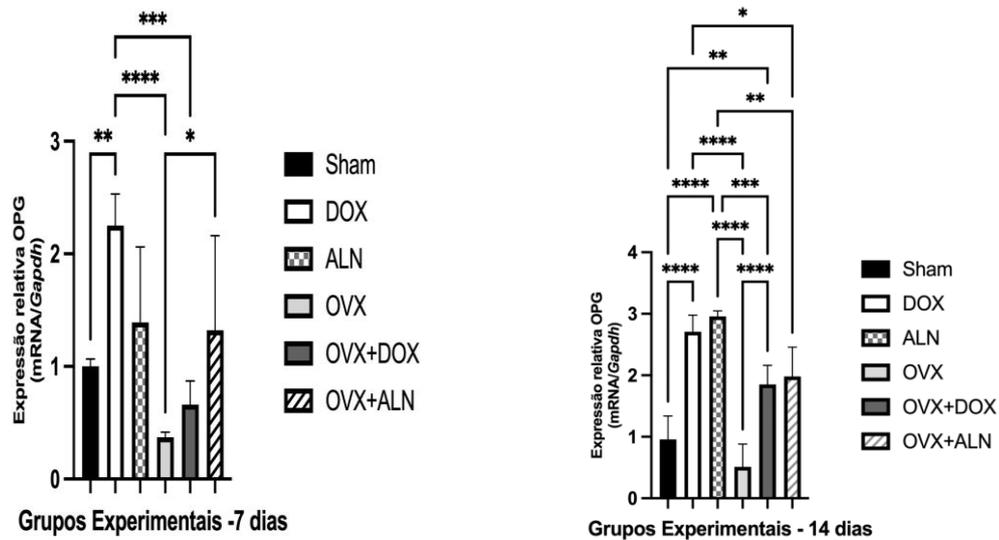


Figura 12: Comparação inter-grupo. Foram calculados os efeitos da dose subantimicrobiana de doxiciclina (DOX) sobre a expressão de OPG níveis de mRNA monitorados em tecido ósseo, apresentados pela proporção: nível de expressão de mRNA/GAPDH.mRNA (razão de produtos de PCR para o gene alvo/GAPDH medido em PCR-RT). Os dados representam a média e desvio padrão (DP). Os dados foram coletados das amostras isoladas do tecido ósseo de 1) SHAM, 2) doxiciclina (DOX), 3) alendronato (ALN), 4) ovariectomizado (OVX), 5) ovariectomizado + doxiciclina (OVX+DOX), 6) ovariectomizado + alendronato (OVX+ALN); no dia-7 e no dia-14. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA, seguida do teste de Tukey).

5.4.2 RANKL

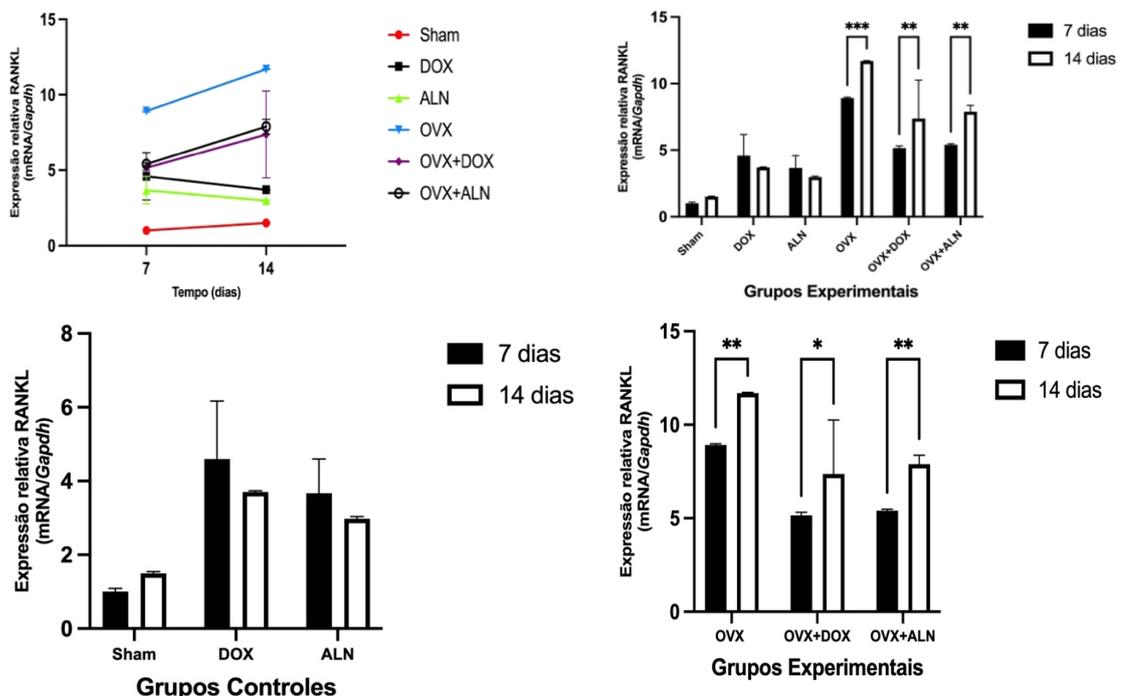


Figura 13: Comparação intra-grupo. Foram calculados os efeitos da dose subantimicrobiana de doxiciclina (DOX) sobre a expressão de RANKL níveis de mRNA monitorados em tecido ósseo, apresentados pela proporção: nível de expressão de mRNA/GAPDH.mRNA (razão de produtos de PCR para o gene alvo/GAPDH medido em PCR-RT). Os dados representam a média e desvio padrão (DP). Os dados foram coletados das amostras isoladas do tecido ósseo de 1) SHAM, 2) doxiciclina (DOX), 3) alendronato (ALN), 4) ovariectomizado (OVX), 5) ovariectomizado + doxiciclina (OVX+DOX), 6) ovariectomizado + alendronato (OVX+ALN); no dia-7 e no dia-14. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA, seguida do teste de Tukey).

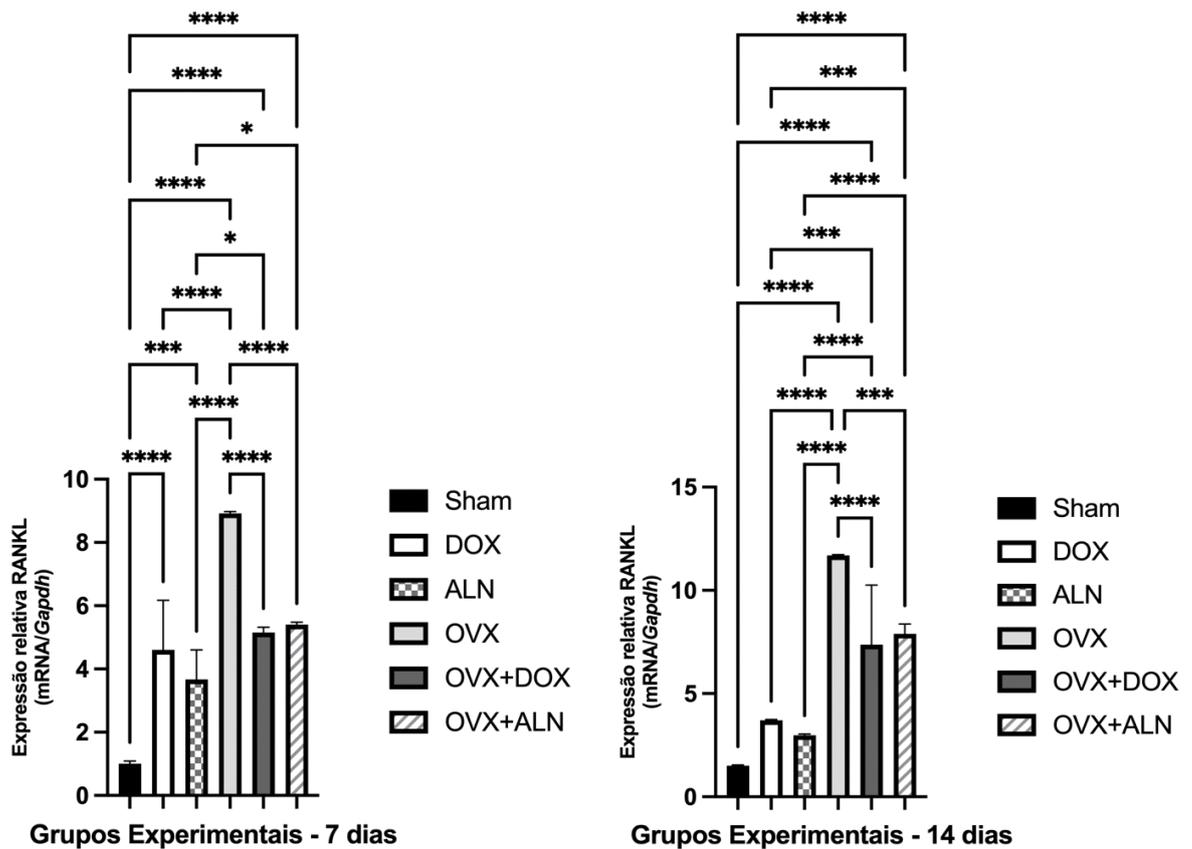


Figura 14: Comparação inter-grupo. Foram calculados os efeitos da dose subantimicrobiana de doxiciclina (DOX) sobre a expressão de RANKL níveis de mRNA monitorados em tecido ósseo, apresentados pela proporção: nível de expressão de mRNA/GAPDH.mRNA (razão de produtos de PCR para o gene alvo/GAPDH.mRNA (razão de produtos de PCR para o gene alvo/GAPDH medido em PCR-RT). Os dados representam a média e desvio padrão (DP). Os dados foram coletados das amostras isoladas do tecido ósseo de 1) SHAM, 2) doxiciclina (DOX), 3) alendronato (ALN), 4) ovariectomizado (OVX), 5) ovariectomizado + doxiciclina (OVX+DOX), 6) ovariectomizado + alendronato (OVX+ALN); no dia-7 e no dia-14. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA, seguida do teste de Tukey).

5.4.3 RANK

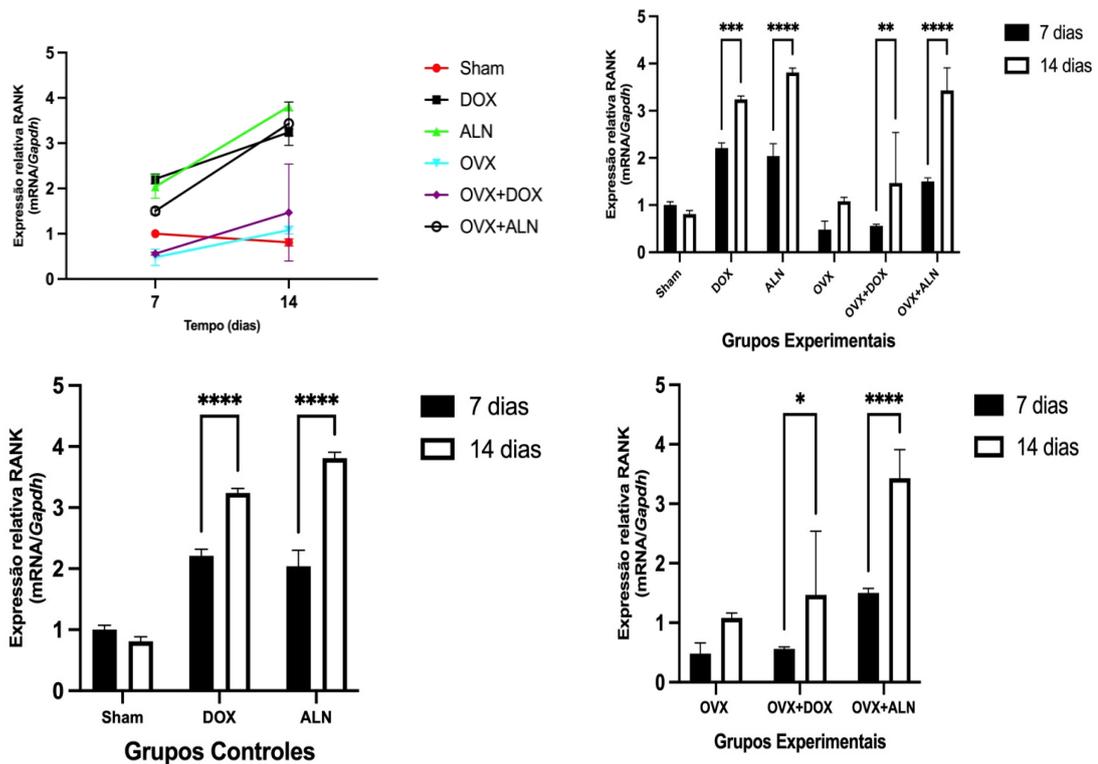


Figura 15: Comparação intra-grupo. Foram calculados os efeitos da dose subantimicrobiana de doxiciclina (DOX) sobre a expressão de RANK níveis de mRNA monitorados em tecido ósseo, apresentados pela proporção: nível de expressão de mRNA/GAPDH.mRNA (razão de produtos de PCR para o gene alvo/GAPDH medido em PCR-RT). Os dados representam a média e desvio padrão (DP). Os dados foram coletados das amostras isoladas do tecido ósseo de 1) SHAM, 2) doxiciclina (DOX), 3) alendronato (ALN), 4) ovariectomizado (OVX), 5) ovariectomizado + doxiciclina (OVX+DOX), 6) ovariectomizado + alendronato (OVX+ALN); no dia-7 e no dia-14. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA, seguida do teste de Tukey).

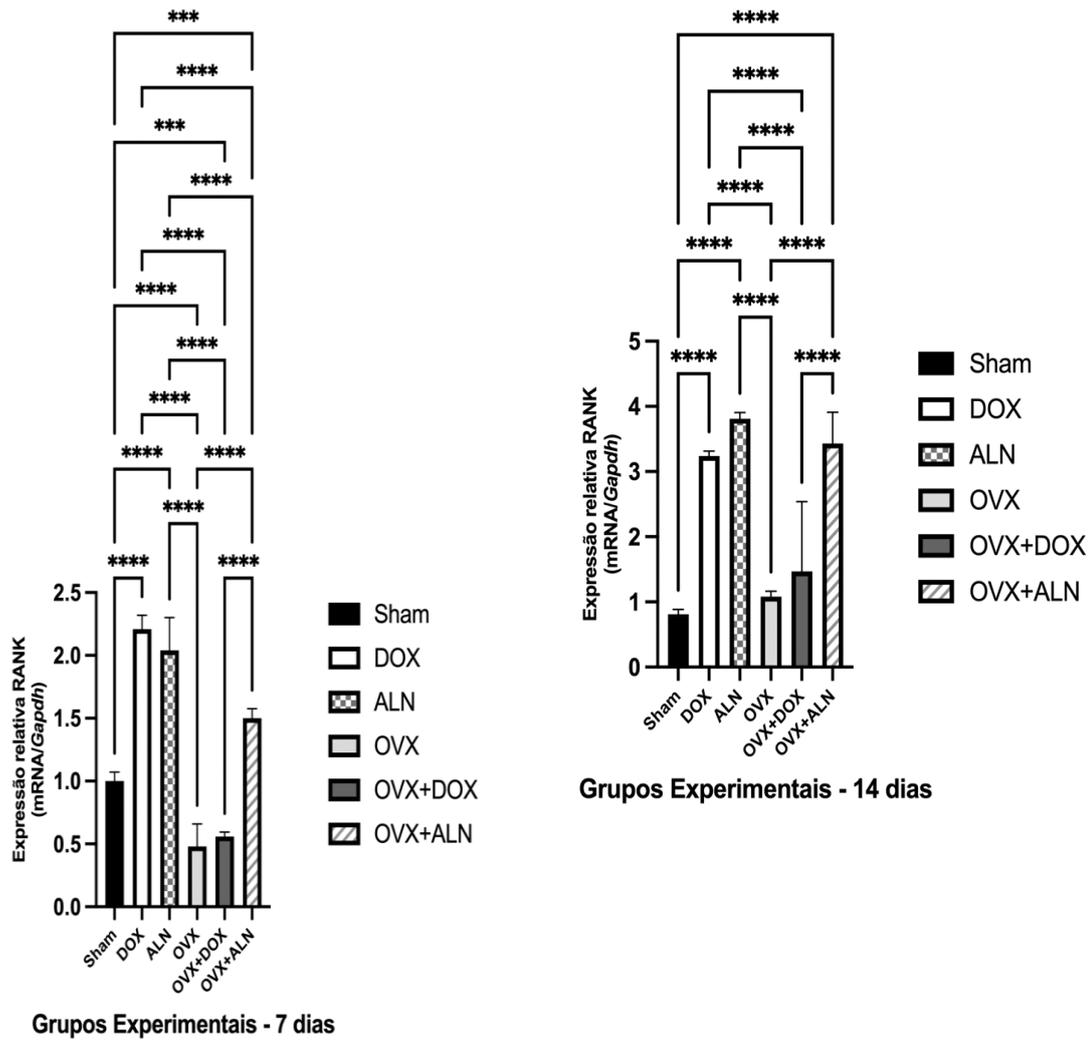


Figura 16: Comparação inter-grupo. Foram calculados os efeitos da dose subantimicrobiana de doxiciclina (DOX) sobre a expressão de RANK níveis de mRNA monitorados em tecido ósseo, apresentados pela proporção: nível de expressão de mRNA/GAPDH.mRNA (razão de produtos de PCR para o gene alvo/GAPDH medido em PCR-RT). Os dados representam a média e desvio padrão (DP). Os dados foram coletados das amostras isoladas do tecido ósseo de 1) SHAM, 2) doxiciclina (DOX), 3) alendronato (ALN), 4) ovariectomizado (OVX), 5) ovariectomizado + doxiciclina (OVX+DOX), 6) ovariectomizado + alendronato (OVX+ALN); no dia-7 e no dia-14. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA, seguida do teste de Tukey).

A expressão gênica relativa de OPG e RANKL nos osteoblastos ao redor das trabéculas ósseas neoformadas sugere o grau de turnover ósseo, bem como possível atividade de síntese das duas respectivas proteínas, pelos osteoblastos durante o processo de reparo alveolar, após aplicação da força ortodôntica.

Aos 07 dias pós aplicação da força ortodôntica, os grupos ovariectomizados (OVX, OVX+DOX e OVX+ALN) apresentaram maior turnover ósseo (representado pela relação OPG/RANKL), enquanto os grupos DOX, ALN e SHAM apresentaram menor turnover ósseo; porém, o grupo OVX+ALN apresentou o turnover ósseo ligeiramente maior que o grupo OVX+DOX (Figura 17).

Aos 14 dias pós aplicação da força ortodôntica, os grupos ALN e DOX apresentaram o maior turnover ósseo, seguidos dos grupos OVX+ALN e OVX+DOX, enquanto os grupos OVX e SHAM apresentaram menor turnover ósseo; porém, o grupo SHAM apresentou o turnover ósseo ligeiramente maior que o grupo OVX (Figura 17).

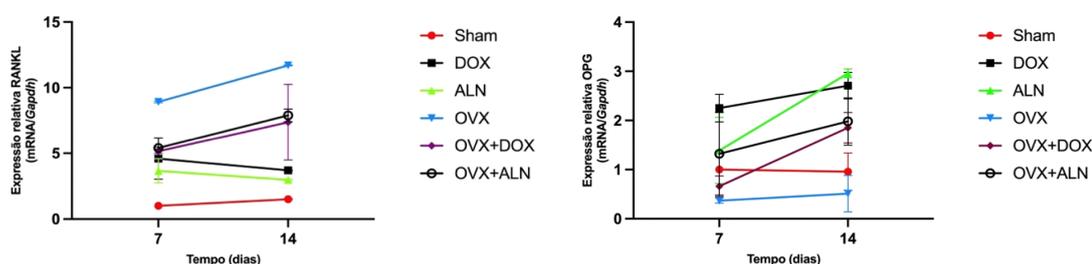


Figura 17: Evolução da expressão do RANKL níveis de mRNA e OPG níveis de mRNA, durante o período experimental. Os dados foram coletados das amostras isoladas do tecido ósseo de 1) SHAM, 2) doxíciclina (DOX), 3) alendronato (ALN), 4) ovariectomizado (OVX), 5) ovariectomizado + doxíciclina (OVX+DOX), 6) ovariectomizado + alendronato (OVX+ALN); no dia-7 e no dia-14. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA, seguida do teste de Tukey).

A análise dos dados mostrou que o grupo DOX e ALN apresentou níveis significativamente aumentados da expressão de mRNA RANKL e OPG no tecido ósseo (Figura 17), em comparação com o grupo SHAM ($p < 0,05$), nos dois períodos analisados. No grupo OVX, houve maior expressão de mRNA RANKL, e menor de OPG.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, tem-se observado uma tendência mundial à queda nos níveis de mortalidade e ao aumento da expectativa de vida da população, tornando o número de idosos cada vez maior. Transformações ocorridas no país acarretaram alterações no perfil de morbimortalidade, exigindo mudanças na forma com que a sociedade enfrenta os novos problemas de saúde (DUARTE; BARRETO, 2012; CAMARGOS; BOMFIM, 2017).

Com o envelhecimento da população brasileira, há um aumento na prevalência de doenças crônicas não transmissíveis, como a osteoporose, que se caracteriza pela diminuição da densidade mineral óssea, podendo exigir tratamento a partir do uso de medicações (CAMARGOS; BOMFIM, 2017). Da mesma forma, também se tem observado um aumento da demanda de pacientes adultos e idosos em busca do tratamento ortodôntico (CAPELOZZA FILHO et al., 2001; MALTAGLIATI; MONTES, 2007). Alguns fatores devem ser avaliados para o tratamento desses pacientes; entre eles, a sua história médica e o uso de medicações, que podem interferir na remodelação óssea.

Várias opções de tratamento farmacológico têm sido continuamente desenvolvidas (BYUN et al., 2017), sendo os bisfosfonatos o “ pilar” do tratamento e, considerado, ainda, “padrão ouro” para o tratamento da doença osteoporótica, baseado na sua segurança e eficácia (RUSSEL et al., 2008).

Os bisfosfonatos são potentes supressores da atividade dos osteoclastos, aumentando a densidade mineral óssea e reduzindo o número de fraturas em pacientes com osteoporose e/ou osteopenia. Visto que as forças ortodônticas promovem eventos físicos e biológicos que são críticos na remodelação óssea, o uso dessas drogas pode influenciar a movimentação dentária (VENKATARAMANA et al., 2014; SALAZAR et al., 2015; FRANZONI et al., 2017; NAKAS et al., 2017).

Apesar do alendronato de sódio ser um dos medicamentos comercialmente disponíveis mais utilizados no tratamento da osteoporose, tem sido relatado que este pode levar à osteonecrose. Na presente pesquisa, nos grupos que receberam o alendronato, nenhum animal apresentou sinal de osteonecrose, corroborando com os estudos anteriores que utilizaram metodologias semelhantes (KARRAS et al.,

2009; FUJIMURA et al., 2009; CHOI et al., 2010; SIRISOONTORN et al., 2012; KAIPATUR et al., 2013; HASHIMOTO et al., 2013; VENKATARAMANA et al., 2014; SALAZAR et al., 2015; NAKAS et al., 2017; FRANZONI et al., 2017), considerando que, no nosso estudo, a administração da medicação foi realizada por 60 dias.

Visto que o número de pacientes adultos que buscam o tratamento ortodôntico que fazem uso de bisfosfonatos é crescente, faz-se necessário conhecer as alterações metabólicas e os efeitos que esses medicamentos antirreabsortivos podem causar nos maxilares durante a movimentação ortodôntica. Assim, este trabalho avaliou uma alternativa de tratamento, com a utilização da doxiciclina, em doses subantimicrobianas, analisando seu efeito sobre a movimentação ortodôntica induzida, em modelo experimental de ratas ovariectomizadas.

O modelo experimental empregado nesta pesquisa é o mais utilizado na pesquisa de movimentação dentária induzida, utilizando os molares de ratos Wistar, da linhagem *Rattus norvegicus* (SALAZAR et al., 2011; HELLER; NANDA, 1979; ARIAS; MVB, SZEJNFELD, 1997; HERNANDES et al., 2011), visto a facilidade para instalação do dispositivo nesses animais, a possibilidade de avaliação dos processos biológicos durante a movimentação e a interação com diversos fármacos (REN et al., 2004; KARRAS et al., 2009; FUJIMURA et al., 2009; CHOI et al., 2010; CHOI et al., 2010; SIRISOONTORN et al., 2012; KAIPATUR et al., 2013; HASHIMOTO et al., 2013; VENKATARAMANA et al., 2014; SALAZAR et al., 2015; FRANZONI et al., 2017; NAKAS et al., 2017), permitindo avaliar as alterações ósseas decorrentes de distúrbios sistêmicos e medicamentosos associados ao tratamento de outras doenças (CONSOLARO; MARTINS-ORTIZ, 2005). Os molares murinos não apresentam rizogênese contínua e essa característica, associada à morfologia radicular favorável, permite a extrapolação dos resultados para humanos, considerando-se as limitações inerentes a qualquer metodologia em animal experimental (FARRIS, 1963; PORTER, 1967).

No presente estudo, optou-se pela utilização de ratas, corroborando com grande parte dos estudos anteriores, considerando que as alterações hormonais presentes nas fêmeas pudessem exercer algum tipo de influência nos resultados do estudo e que os trabalhos prévios que utilizaram fêmeas realizaram a ovariectomia (SALAZAR et al., 2015; FRANZONI et al., 2017).

Desta forma, nesta pesquisa, utilizou-se a ovariectomia, com o intuito de avaliar o efeito da doxiciclina, em dose submicrobiana, comparado com o alendronato, sobre o metabolismo ósseo, pois este modelo de pesquisa tem se mostrado particularmente útil para investigar a perda de osso trabecular em decorrência da deficiência de estrógeno. Esse aspecto é bastante importante se considerarmos o modelo experimental utilizado em nosso estudo.

A ovariectomia simula a perda de massa óssea decorrente da carência de estrógenos, mimetizando a osteoporose feminina, pós-menopáusia (HERNANDES et al., 2011; NEWMAN et al., 1995). Após três meses da remoção dos ovários ocorre uma significativa perda de massa óssea no fêmur de ratas (HERNANDES et al., 2011), e apesar dos ossos da face apresentarem um turnover mais lento, a partir de dois (TANAKA et al., 2011) (SHIRAI et al., 2011) a três meses, a maxila de ratas também é afetada de forma significativa.

A literatura tem mostrado que a remoção de estrógeno está relacionada ao aumento da ingestão de alimentos e ao aumento de peso em roedores (CHEN; HEIMAN, 2001; YONEDA et al., 1998). O aumento de peso decorrente da hiperfagia causada pela ovariectomia ocorre tanto na massa magra quanto no tecido gorduroso dos animais (CHEN; HEIMAN, 2001). Assim, o sucesso da ovariectomia, em reduzir os níveis de hormônios ovarianos, em nosso trabalho, pode ser avaliado através das alterações de peso corporal dos animais, sendo observado um aumento de peso significativo dos animais ovariectomizados, comparados com o grupo controle nos períodos de 60 e 90 dias (Tabelas 1 e 2 e Figura 4).

Na presente pesquisa, houve aumento da massa corpórea em todos os animais, de todos os grupos analisados, ao final do experimento; entretanto, com diferença estatisticamente significativa entre alguns grupos, principalmente quando comparou-se os grupos que sofreram ovariectomia com os respectivos controles. Tal resultado corrobora com os achados de outros autores (CHEN; HEIMAN, 2001; KIMURA et al., 2002; KAIPATUR et al., 2013; NAKAS et al., 2017; MITAZAKI et al., 2016; MACEDO et al., 2017), em que todos os animais também se mantiveram saudáveis, sem perda de peso ao longo do experimento. Provavelmente, isso deve-se ao fato que as medicações utilizadas nesses estudos, com suas respectivas doses e vias de administração, não foram capazes de induzir uma

gastrotoxicidade no animal. Outra hipótese relevante para a não perda de peso dos animais nos tempos avaliados foi que os dispositivos utilizados para indução da movimentação dentária não apresentaram grande influência na alimentação dos ratos, provavelmente devido ao curto período de tempo de movimentação dentária (7 e 14 dias). Esses resultados também estão de acordo com os estudos de Lanza et al. (2002) e de Zografos et al. (2009), os quais afirmam que, apesar de injúrias esofágicas estarem relacionadas ao tratamento com alendronato de sódio em humanos, não há um aumento significativo dessa incidência em pacientes usuários dessa droga quando a mesma é administrada uma vez por semana.

Quanto ao dispositivo para indução da movimentação dentária nesse modelo animal, a maioria dos estudos tem utilizado uma mola fechada de NiTi, presa com fio de amarrilho 0.008 polegadas ao primeiro molar e aos incisivos (KARRAS et al., 2009; FUJIMURA et al., 2009; CHOI et al., 2010; SIRISOONTORN et al., 2012; HASHIMOTO et al., 2013; VENKATARAMANA et al., 2014; SALAZAR et al., 2015; FRANZONI et al., 2017), em consonância com o presente estudo. Porém, encontra-se, também na literatura, a utilização de separadores elásticos entre os incisivos, ou de mola fechada de NiTi presa ao primeiro molar e a um mini-implante próximo à região dos incisivos, para indução da movimentação dentária (KAIPATUR et al., 2013; NAKAS et al., 2017). Porém, devido às propriedades físicas da mola de NiTi, optou-se por este tipo de material, uma vez que a força liberada é constante.

A quantidade de força para movimentação ortodôntica em ratos apresentada na literatura varia entre 10 e 100gF (KARRAS et al., 2009; CHOI et al., 2010; SIRISOONTORN et al., 2012; KAIPATUR et al., 2013; HASHIMOTO et al., 2013; SALAZAR et al., 2015; FRANZONI et al., 2017), observando-se, desse modo, a falta de padronização entre os autores quanto à intensidade de força, considerada ideal para esse fim. Segundo a revisão sistemática de Ren et al. (2004), de um total de 153 artigos que induziram a movimentação dentária em ratos, 20% utilizaram uma força menor que 20gF; 37%, uma força entre 20-50gF; 12%, uma força entre 50-100gF; 1%, uma força maior que 100gF; e os 30% restantes não especificaram a quantidade de força utilizada.

Também, tem sido demonstrado que o uso de uma força de 10 a 50gF promove uma maior quantidade de movimentação ortodôntica, enquanto forças

excessivas levam a um decréscimo na quantificação desse processo (NAKANO et al., 2014). Desse modo, optou-se, no presente estudo, pela utilização de uma força de 40gF, com base em trabalhos na área (REN et al., 2003; MAGANZINI; WONG; AHMED, 2010; GAMEIRO et al., 2008), a partir do uso de uma mola fechada de NiTi, visando avaliar a quantidade de movimentação e o trabeculado ósseo, estando, assim, dentro da faixa recomendada pela maioria da literatura.

Em relação ao tempo de movimentação ortodôntica realizada a partir do uso de uma mola de NiTi, também houve variação entre os estudos. Na pesquisa de Salazar et al. (2015), o tempo total foi de 7 dias, diferenciando-se dos estudos de Franzoni et al. (2017), Fujimura et al. (2009) e Hashimoto et al. (2013), em que os tempos foram de 10, 12 e 14 dias, respectivamente. Já em outros dois estudos, o tempo total foi de 28 dias (KARRAS et al., 2009; SIRISOONTORN et al., 2012). Na revisão sistemática realizada por Ren et al. (2004), observou-se que 40% dos estudos utilizaram 7 dias ou menos, 31%, de 7 a 14 dias; 18%, de 14 a 28 dias; 1%, mais que 28 dias; e os 10% restantes não especificaram a quantidade de dias. Já no estudo de Choi et al. (2010) avaliou-se com 3, 6, 9, 12 e 15 dias, aplicando uma força de 60gF, e os autores constataram que a partir do 12º dia foi possível observar mudança na quantidade de movimentação dentária. No presente estudo, devido aos objetivos propostos, optou-se por realizar a movimentação ortodôntica durante 7 e 14 dias, corroborando com a média de dias dos estudos prévios citados.

O movimento ortodôntico é provocado através da aplicação de forças mecânicas controladas, criando uma resposta biológica no dente, com uma série de eventos no ligamento periodontal e no osso alveolar, o que leva a uma remodelação óssea (KAIPATUR et al., 2013; ARAÚJO et al., 2015). No lado de pressão, haverá uma diminuição do fluxo sanguíneo no ligamento periodontal comprimido, provocando alterações teciduais, que, em conjunto com a ativação de mediadores químicos, levará à formação dos osteoclastos responsáveis pela reabsorção óssea. No lado de tração, esses eventos biológicos irão promover a atividade osteoblástica e a consequente deposição de tecido osteóide, que, posteriormente, será mineralizado (VON BOHL; KUIJPERS-JAGTMAN, 2009).

Vários estudos (FUJIMURA et al., 2009; KARRAS et al., 2009; CHOI et al., 2010; SIRISOONTORN et al., 2012; VENKATARAMANA et al., 2013; KAIPATUR et

al., 2013; HASHIMOTO et al., 2013; SALAZAR et al., 2015; NAKAS et al., 2017; FRANZONI et al., 2017), utilizando bisfosfonatos, verificaram que esses medicamentos reduziram a taxa de movimentação ortodôntica, o número de osteoclastos e a reabsorção radicular (CHOI et al., 2010; SIRISOONTORN et al., 2012) no lado de pressão, concordando com a presente pesquisa, pois, tanto o ALN quanto a DOX mostraram que retardam significativamente a movimentação ortodôntica nesses animais. O grupo OVX, por outro lado, foi o que obteve maior taxa de movimentação dentária (Tabela 5, Figuras 5 a 7).

Sabe-se da relação entre taxa de movimentação dentária e reabsorção radicular (CHOI et al., 2010; SIRISOONTORN et al., 2012). Apesar da reabsorção radicular não ter sido foco da presente pesquisa, os resultados discutidos anteriormente corroboram com um estudo de Mavragani et al. (2005), no qual a movimentação dental ortodôntica executada em camundongos gerou menor reabsorção radicular dental em grupos submetidos a doxiciclina por 7, 10 e 14 dias de tratamento ortodôntico, uma vez que na movimentação dental tem-se uma reação inflamatória considerada como efeito colateral normal na prática ortodôntica (RYGH, 1977).

Quando se analisa a taxa de movimentação dentária, os resultados do presente estudo demonstraram uma redução na MDI (menor diastema entre molares) nos grupos que fizeram uso do alendronato de sódio, quando comparados com o grupo controle nos dois períodos analisado (7 e 14 dias). Essa diminuição foi estatisticamente significativa (Figuras 5 e 7). Esses resultados corroboram com os estudos prévios (KARRAS et al., 2009; SALAZAR et al., 2015; FRANZONI et al., 2017) que demonstraram que houve movimentação ortodôntica significativamente menor no grupo tratado com alendronato, em relação aos grupos controles.

Considerando-se a metodologia do presente estudo, pode-se concluir que a aplicação de alendronato de sódio diminuiu a quantidade de movimentação dentária, em comparação ao grupo ovariectomizado não tratado. A literatura (MAZZIEIRO, 1999) mostrou que o tratamento com bisfosfonatos por até 21 dias parece não influenciar na quantidade de movimento dentário induzido, em comparação a controles, discordando do presente experimento, que mostrou que o grupo ALN apresentou uma menor taxa de movimentação dentária. Provavelmente esse resultado seja devido ao período de administração da droga, que foi 90 dias.

Tem sido demonstrado que pacientes submetidos a tratamento com bisfosfonatos por períodos mais longos podem apresentar menores taxas de movimentação dentária, dificultando o tratamento ortodôntico (ZAHROWSKI, 2007; RINCHUSE et al., 2007). Igualmente, em estudos em ratos de maior tempo de observação (de duas a quatro semanas), houve menor movimentação sob ação do ALN (KARRAS et al., 2009; IGARASHI et al., 1994), concordando com os resultados da presente pesquisa.

No presente estudo, todos os grupos apresentaram progressivamente maior movimentação, após 7 e 14 dias (Tabela 4, Figura 5), em comparação com o período inicial ($P < 0.05$). Entretanto, os animais ovariectomizados que não receberam tratamento medicamentoso apresentaram maior distância interdentária em ambos os períodos, comparados com os dos demais grupos ($p < 0,05$ aos 7 e 14 dias).

Relato na literatura (MAZZIEIRO, 1999) mostra que, no curto período de administração do bisfosfonato, a movimentação dentária nos grupos ovariectomizados sob efeito do alendronato (OVX+ALN) foi similar ao grupo controle. Desta forma, os pacientes sob a prescrição do alendronato de sódio por períodos curtos podem realizar a movimentação dentária normalmente. No curto período do presente estudo, embora os resultados tenham mostrado uma tendência a menor quantidade de movimentação nos grupos tratados com ALN, essa diferença não foi estatisticamente significativa em relação ao grupo controle não ovariectomizado.

A redução da movimentação dentária, no grupo ALN, parece estar relacionada ao mecanismo de ação dos bisfosfonatos nitrogenados que atuam na inibição da reabsorção óssea, a partir do bloqueio da enzima farnesil pirofosfato sintase na via do mevalonato, interferindo na modificação pós-translacional de proteínas como as GTPases, que regulam uma variedade de processos importantes para a função dos osteoclastos, incluindo a morfologia celular e a organização do citoesqueleto, sendo capazes de promover a apoptose dessas células (GHONEIMA et al., 2010; BALLANTYNE, 2015).

Desse modo, uma redução na atividade dos osteoclastos pode levar a uma movimentação dentária mais lenta ou em menor quantidade. Com o tempo, as moléculas de bisfosfonato incorporam-se na matriz óssea, tornando o turnover mais

lento, requerendo mais tempo para a sua organização, em função da inibição da atividade osteoclástica (RODAN, 1998). Nesses indivíduos, portanto, seriam necessários ciclos mais longos de reativação para que ocorra a dissipação da força; caso contrário, poderiam ocorrer grandes áreas hialinas por um acúmulo de forças no ligamento periodontal e, conseqüentemente, o aparecimento de reabsorções radiculares.

O ALN é altamente eficaz na prevenção da perda óssea associada à ausência de estrógeno endógeno, induzindo a um aumento mantido na massa óssea durante a terapia em animais. Similarmente, em humanos, promove a recuperação da densidade mineral, por meio de sua ação inibidora sobre os osteoclastos (RODAN, 1996). Desta forma, com o processo de remodelação em equilíbrio, há uma diminuição da atividade osteoclástica, sem interferir diretamente na atividade neoformadora (LICATA, 2005). Esta diminuição da atividade osteoclástica deve ter sido a responsável pelo menor grau de movimentação dentária dos grupos OVX+ALN e OVX+DOX, em comparação com o grupo OVX.

Em relação à doxiciclina (DOX), não houve diferença estatística, comparada com o grupo SHAM, mas, em relação aos três grupos que sofreram ovariectomia (OVX, OVX+DOX e OVX+ALN), a movimentação dentária foi maior nestes grupos, em relação aos grupos DOX e ALN (Figura 7). Portanto, a DOX pode vir a ser uma opção ao ALN; porém, outros estudos também são necessários, para estabelecer seu real benefício clínico, principalmente em relação à manutenção dos resultados obtidos a longo prazo, para que se possa estabelecer a sua correta indicação. Além da movimentação ortodôntica, pacientes osteoporóticos com fraturas ósseas, necessidade de cirurgias ortognáticas ou exodontias também poderão ser beneficiados com os efeitos positivos da DOX. Porém, não existem estudos na literatura que avaliem a remodelação óssea em ratas osteoporóticas com aplicação da DOX, em doses subantimicrobianas, submetidas ao movimento dentário ortodôntico.

Todavia, na literatura, tem-se que a doxiciclina não melhorou a qualidade de osso alveolar em reparo tecidual em ratas Wistars submetidas à extração dental e tratadas, posteriormente, por 7 dias, por doxiciclina e eritromicina (SHAHABOOEI et al., 2015). Pode-se entender que, no referido trabalho, as ratas foram submetidas a um período curto de tratamento com doxiciclina (7 dias) e a

quantificação de osso neoformado ficou aquém do ideal, devido a este fato. Além disso, os autores chegaram à conclusão que tanto a doxiciclina quanto a eritromicina aumentam a quantidade de osso neoformado, em comparação aos ossos controle, mas não houve diferenças estatisticamente significantes no estudo de Shahabooui et al. (2015). Outro estudo, executado em cães, demonstrou que a doxiciclina reduziu a perda óssea ocasionada pela cirurgia endodôntica periradicular (CUMMINGS; TORABINEJAD, 2000).

Em humanos, a dose comum utilizada de alendronato de sódio para tratamento da osteoporose é de 1mg/kg/semana; entretanto, ainda não há um consenso quanto à dose adequada para testes em animais (LANZA et al., 2002; SALAZAR et al., 2015). Apesar de que o índice metabólico do rato é, aproximadamente, duas vezes mais veloz do que a do homem, no presente estudo, optou-se por testar 0,7mg/kg/semana (VOLPON et al., 2008), um pouco menos que a dosagem recomendada para humanos. Em outros estudos, houve uma variação entre as doses aplicadas de acordo com o tempo e as vias de administração adotadas. No estudo de Kaipatur et al. (2013), testou-se a dosagem de 0,015mg/kg, via subcutânea, duas vezes na semana, por 28 dias. No estudo de Salazar et al. (2015), também se utilizou a via subcutânea, nas dosagens de 1mg/kg e 2mg/kg, duas vezes na semana, por três meses, e no de Franzoni et al. (2017), a dose de 2,5mg/kg, uma vez por dia, via subcutânea, por 35 dias. Na presente pesquisa, as ratas passaram a receber as injeções de ALN, e a dosagem utilizada mostrou-se eficaz no controle da perda mineral, tendo apresentado taxa de formação óssea comparável do período inicial ($95,3 \pm 2,9$) aos 14 dias ($93,1 \pm 1,9$) (Tabela 5, Figuras 8 a 10).

A doxiciclina foi administrada na água de beber, conforme estudo de Issa et al.

(2015), por 60 dias e, foi realizada a manutenção de acordo com um gráfico diário do quanto foi ingerido de água em cada caixa. A dose de 30 mg/kg/dia foi baseada em estudos previamente publicados (BRIEST et al., 2003; GUIMARAES et al., 2011; CASTRO et al., 2012; THARAPPEL et al., 2016). Essa dosagem mostrou-se eficaz no controle da perda mineral, tendo apresentado taxa de formação óssea comparável ao grupo SHAM movimentado (Tabela 5, Figuras 8 a 10).

A supressão da produção de estrógeno (OVX) provocou uma perda de cerca de 30% a 40% de osso inter-radicular três meses após a ovariectomia (Tabela 5), sugerindo que essa perda mineral seja a responsável pelo maior grau de movimentação dentária nos animais ovariectomizados que não receberam ALN e nem DOX.

Existem, ainda, controvérsias acerca do uso da doxiciclina em doses subantimicrobianas. Folwarczna, Pytlik e Janiec (2003) mostraram que, em modelo experimental de indução de osteopenia por ovariectomia bilateral em ratas, a doxiciclina provocou efeitos deletérios nos ossos dessas ratas. Pode-se explicar isso devido ao fato de os animais ainda não terem a osteopenia estabelecida. De acordo com os autores, as ratas receberam o medicamento por quatro semanas, poucos dias após a indução de osteopenia. O presente trabalho foi embasado em um estudo prévio, onde tem-se que em três meses se estabelece a osteopenia nos modelos experimentais de ovariectomia (ISSA et al., 2015). Além disso, Folwarczna Pytlik e Janiec (2003) administraram a doxiciclina de modo concomitante com o estabelecimento da osteopenia por um mês. No presente estudo, aguardamos 90 dias para o estabelecimento da osteopenia e, com a osteopenia estabelecida, realizamos o tratamento com o medicamento por 60 dias. Isso explica a diferença os resultados obtidos no trabalho de Folwarczna, Pytlik e Janiec (2003), se comparados com os do presente trabalho.

Transpondo aos seres humanos, Payne et al. (2007) demonstraram, em seu estudo longitudinal de dois anos, com 128 pacientes randomizados, que o uso de doxiciclina em dose de 20mg, duas vezes ao dia (dose considerada subantimicrobiana), acrescentada a uma dose diária de cálcio e vitamina D, não apresentou melhoria ou danos a mulheres em menopausa com doença periodontal. Por outro lado, em outros estudos anteriores, foi demonstrado que o uso de doxiciclina, nas mesmas condições demonstradas anteriormente, associada a raspagens dentais (raspagem de cálculo dental ou placa), promoveu uma melhora expressiva na qualidade óssea alveolar (CATON et al., 2000; GOLUB et al., 2001; PRESHAW et al., 2004). No entanto, existem diversos questionamentos sobre o fato de a doxiciclina ser um antibiótico e não apresentar aumento de resistência microbiana, em doses subantimicrobianas. Em humanos, a dose subantimicrobiana de 20mg/kg/dia não apresenta aumento da flora subgengival (WALKER et al.,

2007) e o seu uso como inibidor de metaloproteinase para tratamento de periodontite já foi comprovado como seguro (GOLUB et al., 1995; THOMAS et al., 2000).

Além disso, o uso da doxiciclina, em doses subantimicrobianas, já se provou como não antimicrobiano, não afetando as floras comensais da pele (SKIDMORE et al., 2003), uma vez que as tetraciclinas, mais precisamente a minociclina e a doxiciclina, são largamente usadas para este fim (problemas de pele), em doses antimicrobianas (BHAMBRI; KIM, 2009; COHEN, 2007; COHEN; GROSSMAN, 2004; DEL ROSSO, 2004; ELSTON, 2007; PELLE; CRAWFORD; JAMES, 2004). No presente estudo, realizou-se a ingestão de doxiciclina na água de beber. A dose foi cuidadosamente baseada no peso corporal das ratas, para garantir a ingestão de doxiciclina de maneira fiel aos miligramas/quilo por dia, para cada grupo exposto ao medicamento.

Em coelhos com osteoartrite induzida metodologicamente houve uma melhora em estágio inicial dos danos articulares dos animais tratados com uma dose subantimicrobiana de doxiciclina (2,2mg/kg/dia), o que demonstra que os danos articulares futuros podem ser amenizados (PINNEY et al., 2012). A doxiciclina, em doses subantimicrobianas 1,5mg/kg/dia, em tratamento por três semanas, diminuiu consideravelmente a perda óssea em ratos machos com indução de diabetes (TELLA et al., 2014). Além disto, foi demonstrado que em modelo *in vitro* e *in vivo* a doxiciclina é capaz de promover uma melhor combinação entre o osso e implante e, ainda, evitar substancialmente que o implante seja acometido por infecções (WALTER et al., 2014). Kutan et al. (2016) comprovaram que, em modelo experimental de regeneração óssea auxiliada por membrana de colágeno e doxiciclina 1mg/cm² em sítio tibial contaminado por bactéria, a doxiciclina leva à regeneração óssea de boa qualidade (KUTAN et al., 2016).

A doxiciclina, administrada via oral (1,5mg/kg/dia) concomitante com eritromicina (2mg/kg/dia) intraperitoneal em modelos experimentais de reparo ósseo em ratos com extração de molares, aferidos nos períodos de 7, 14 e 28 dias pós-operatórios, apresentara melhor reparo ósseo no grupo com os antibióticos administrados, em comparação aos controles (SHAHABOOEI et al., 2015). A administração de doxiciclina promoveu a regulação negativa de mediadores inflamatórios e recombinantes genéticos pró-inflamatórios, além de uma menor

perda alveolar óssea em ratos machos (CASTRO et al., 2016). Portanto, podemos afirmar que a doxiciclina é um modulador inflamatório que promove efeitos benéficos em reparos ósseos. Isso explica os resultados contidos no presente estudo, que demonstraram o favorecimento ósseo nos grupos submetidos à osteopenia e tratados com doxiciclina.

Considerando as peculiaridades da remodelação óssea após a aplicação de forças ortodônticas e a necessidade de obter melhores entendimentos da formação do tecido ósseo até o término do processo, o presente estudo também teve o objetivo de avaliar a interferência da ovariectomia e seu tratamento com alendronato e doxiciclina no equilíbrio entre RANKL/OPG, duas citocinas importantes que sinalizam diferentes situações na remodelação óssea, durante diferentes períodos da cronologia do processo de reparo alveolar.

Em um processo de remodelação óssea normal, a formação óssea pelos osteoblastos segue a reabsorção pelos osteoclastos e ocorre de maneira precisa e quantitativa. A molécula ativadora e receptora do fator kappa- β da família do fator de necrose tumoral (RANKL), expressada pelos osteoblastos e seus precursores (LACEY et al., 1998), e seu receptor (RANK), expressado em precursores de osteoclastos e osteoclastos maduros (HSU et al., 1999), são reguladores-chaves da remodelação óssea e essenciais para o desenvolvimento e ativação da reabsorção óssea (THEIL et al., 2002). O RANKL também se liga a seu receptor-chamariz, a osteoprotegerina (OPG), expressada pelos osteoblastos e seus precursores (SIMONET et al., 1997). Quando a OPG se liga ao RANKL, limita a ligação entre RANK-RANKL, inibindo assim a sinalização dos eventos que modulam a diferenciação osteoclástica e o desenvolvimento de linfócitos. O equilíbrio entre RANK e OPG é regulado por citocinas e hormônios que determinam as funções osteoclásticas. A alteração neste equilíbrio é crítica nas patologias ósseas, resultando em um aumento da reabsorção óssea.

No presente estudo, DOX e ALN foram capazes de aumentar a expressão gênica tanto do RANKL como da OPG, juntamente com uma redução da reabsorção óssea. Esses resultados, em conjunto, podem apoiar os achados microscópicos do presente estudo, que foram representados por uma redução da perda alveolar óssea no grupo DOX. A movimentação dentária é caracterizada por um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias (SHADDOX et al., 2011);

entre elas, a IL-17, induz a produção de RANKL por osteoblastos e, também estimula os fibroblastos a produzir outros mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-1 β (TAKAHASHI et al., 2005; BEKLEN et al., 2007). Como no presente estudo a DOX e o ALN regularam a expressão gênica do RANKL, seria interessante verificar as expressões de TNF- α , IL-1 β e IL-17, para investigar a relação processo inflamatório e movimentação dentária, principalmente em relação IL-17, que foi recentemente associada à reabsorção radicular (ODA et al., 2003; JOHNSON et al., 2004; EMINGIL et al., 2011).

O grupo OVX apresentou o maior “turnover” ósseo no início do processo de reparo alveolar, representado pela relação de OPG/RANKL; porém, apresentou uma brusca diminuição aos 14 (períodos de intensa atividade celular observado no grupo SHAM). Esta diminuição talvez seja resultante da apoptose osteoblástica que a ovariectomia induz, tendo como consequência a diminuição da liberação de OPG e RANKL por essas células. Apenas após o período de 14 dias de reparo, esta atividade celular tentou se restabelecer. Foi no período de 14 dias do processo de reparo alveolar, que o grupo SHAM apresentou a associação simultânea da maior neoformação de tecido ósseo com o maior *turnover* ósseo, comparado com os demais grupos, enquanto que o grupo OVX apresentou uma brusca redução da quantidade de trabéculas ósseas, sugerindo intensa reabsorção óssea neste período. Essas observações evidenciam o atraso do processo de reparo alveolar e o aumento do turnover ósseo induzido pela ovariectomia.

Duarte et al. (2004) verificaram que a OVX aumenta a perda óssea em periodontites induzidas por ligaduras e afeta negativamente o tecido ósseo de sustentação dental. Nociti et al. (2002) observaram que a OVX diminui o reparo ósseo e sua densidade ao redor de implantes de titânio. Já outros pesquisadores (ELOVIC; HIPPEL; HAYES, 1995; TEÓFILO; BRENTGANI; LAMANO-CARVALHO, 2004) observaram que o declínio de estrógeno induzido pela ovariectomia afeta o turnover ósseo após extração dental, com aumento da reabsorção óssea e redução da formação, corroborando com nossos resultados, nos quais, mesmo aos 14 dias de movimentação dentária ortodôntica, o grupo OVX apresentou menos de 50% do terço médio do alvéolo preenchido por osso e afetou o turnover ósseo representado pela relação entre a expressão gênica OPG/RANKL.

A importância de RANKL e OPG na regulação da homeostasia foi demonstrada pelo fenótipo de ratos geneticamente modificados. Os ratos com ausência do gene da OPG desenvolveram osteoporose severa (BUCAY et al. 1998), pelo aumento do número e da atividade dos osteoclastos, enquanto que a alta expressão de OPG resultou em osteopetrose pela diminuição do número de osteoclastos e diminuição de suas atividades (REN et al., 2004).

Porém, vale destacar que nem sempre a expressão gênica do RNAm de uma determinada proteína significa que a proteína será sintetizada. Em relação às técnicas de avaliações sorológicas, elas muitas vezes não mostram se as proteínas apresentam-se ativas ou não, pois, segundo Rogers e Eastell (2005), é possível que OPG no soro esteja ligada a alguma(s) proteína(s) plasmática(s) e, com isso, apresenta(m)-se inativa(s) e também RANKL é produzida por uma variedade de tipos celulares e sua expressão é regulada por vários fatores fisiológicos e patológicos (BOYCE; XING, 2007). Portanto, a quantidade sorológica de RANKL não se refere apenas ao tecido ósseo. Porém, em nosso experimento, foi utilizado o tecido ósseo do lado de pressão, sendo os resultados mais fidedignos. O ideal seria a associação do PCR com a imunocolocalização de RANKL e OPG, que traria dados bastante relevantes aos nossos questionamentos. A técnica da imunolocalização marca as proteínas já sintetizadas, atuando no local simultaneamente, permitindo a análise espacial das células no tecido.

Além de induzirem a apoptose, o ALN também pode afetar a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos de outras maneiras, como no seu recrutamento, formação e diferenciação (ROSINI et al., 2015). Podem, também, prevenir fatores ativadores de osteoclastos, tais como a interação do ligante do receptor ativador do fator nuclear-kappa- β (RANKL) ao seu receptor (RANK), mediador primário da diferenciação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos (KRISHNAN; PANDIAN; KUMAR, 2015). Devido ao fato de se incorporarem na matriz óssea e possuírem uma meia-vida extremamente longa, eles ainda podem afetar o metabolismo ósseo por até dez anos após o paciente ter completado a terapia (BARTZELA et al., 2009).

Este estudo se destaca em demonstrar a influência da ovariectomia e seu tratamento com DOX e ALN no turnover ósseo, representado pela expressão de RANKL/OPG durante a movimentação dentária ortodôntica. Foi possível mostrar

que a DOX e o ALN modulam a expressão de OPG e RANKL nas células de linhagem osteoblásticas, no processo de reparo alveolar, alterando o turnover ósseo. Esses achados são pertinentes, assim como o balanço de OPG/RANKL é importante na regulação da homeostasia óssea. Os resultados deste estudo sugerem que o tratamento com doxiciclina em doses submicrobianas raloxifeno mantém a atividade osteoblástica ao longo do processo de reparo alveolar, a qual não pôde ser observada com a ovariectomia.

A doxiciclina, em doses submicrobianas, pode ser benéfica no tratamento da osteoporose, reduzindo a reabsorção óssea alveolar e mantendo a quantidade de fibras colágenas, provavelmente agindo na inibição da expressão de citocinas inflamatórias. A partir dos resultados de cada um dos grupos experimentais, foi demonstrada uma ideia do benefício da doxiciclina, em doses submicrobianas, para os grupos que foram induzidas as osteopenias. Diante da possibilidade de acelerar a movimentação ortodôntica e, ao mesmo tempo, ter a osteopenia/osteoporose controlada, sugere-se que a doxiciclina possa ser uma alternativa aos bisfosonatos, após a devida avaliação e indicação do médico. No entanto, há necessidade de mais estudos com relação à suscetibilidade bacteriana com o uso prolongado de DOX.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

1. Houve aumento da massa corpórea em todos os animais, ao final do experimento; entretanto, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos que sofreram ovariectomia, com os respectivos controles;
2. Quanto à movimentação dentária, observou-se uma maior taxa de movimentação, estatisticamente significante, no grupo ovariectomizado (OVX). Os grupos OVX+DOX e OVX+ALN também apresentaram maior taxa de movimentação dentária, quando comparados com os seus grupos controles e com o SHAM, demonstrando que a medicação, nestes grupos, não afetou a movimentação. Quando analisou-se o tempo de observação, todos os grupos tiveram uma maior taxa de movimentação, significativa estatisticamente, no período final de observação;
3. Em relação à porcentagem e ao osso formado, observou-se que no período 7 dias houve uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) nos grupos que sofreram ovariectomia (OVX, OVX+DOX e OVX+ALN), e, no período de 14 dias, a porcentagem de osso voltou a subir em todos os grupos, sendo esse aumento mais expressivo nos grupos tratados com ALN e DOX, e menor no grupo OVX; e
4. Em relação à expressão gênica, a DOX e o ALN foram capazes de aumentar a expressão tanto do RANKL quanto da OPG. O grupo OVX apresentou o maior “turnover” ósseo no início do processo de reparo alveolar, representado pela relação de OPG/RANKL; porém, apresentou uma brusca diminuição aos 14 dias.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABDUL-HUSSIEN, H., et al. Doxycycline therapy for abdominal aneurysm: Improved proteolytic balance through reduced neutrophil content. **J. Vasc. Surg.**, v. 49, n. 3, p. 741-749, mar. 2009.

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

ARAÚJO, A. S., et al. New methodology for evaluation osteoclastic activity induced by orthodontic load. **J. Appl Oral Sci**, [s.l.], v. 23, n. 1, p. 19-25, set./out. 2015.

ARIAS, M. V. B.; SZEJNFELD, V. L. Modelos animais de osteoporose. **Rev. Bras. Reumatol.**, 37, p. 335-338, 1997.

AZUMA, Y., et al., Alendronate distributed on bone surfaces inhibits osteoclastic bone resorption in vitro and in experimental hypercalcemia models. **Bone**, 16(2), p. 235-245, 1995.

BACCARO, L. F., et al. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. **Clinical Interventions in Aging**, [s.l.], v. 10, p. 583-591, 2015.

BALLANTYNE, E. Bisphosphonates: Possible modes of action and implications for dental implant treatment. A review of the literature. **J. Gen. Pract.**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 1- 28, jan./fev. 2015.

BANDEIRA, F.; CARVALHO, E. F. D. Prevalência de osteoporose e fraturas vertebrais em mulheres na pós-menopausa atendidas em serviços de referência. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 10, p. 86-98, 2007.

BARROS SILVA, P. G., et al. Chronic treatment with zoledronic acid alters the expression levels of inflammatory, bone and apoptotic markers and toll-like receptors 2 and 4 in rat dental pulp. **Oral Surg Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod**, [s.l.], 2019. DOI: 10.1016/j.oooo.2019.01.069.

BARTZELA, T., et al. Medication effects on the rate of orthodontictooth movement: A systematic literature review. **Am. J. Orthod Dentofacial Orthop**, [s.l.], v. 135, p. 16-26, jan. 2009.

BATH-BALOGH, M.; FEHRENBACH, M. **Illustrated Dental Embryology, Histology, and Anatomy**. 3. ed. Elsevier, 2010.

BEDOGNI, A., et al. Oral Bisphosphonate–Associated Osteonecrosis of the Jaw After Implant Surgery: A Case Report and Literature Review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 68(7), p. 1662-1666, 2010.

BEKLEN, A., et al. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. **J. Dent Res.**, 86(4), p. 347-351, 2007.

BHAMBRI, S.; KIM, G. Use of Oral Doxycycline for Community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) Infections. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 2, n. 4, p. 45-50, 2009.

BLACK, D. M., et al. Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. **Lancet**, [s.l.], v. 348, p. 1535-1541, 1996.

BOYCE, B. F.; XING, L. **Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin**. *Arthritis Res Ther*, 2007.

BONNET N., et al. Doping dose of salbutamol and exercise training: impact on the skeleton of ovariectomized rats. **Journal of applied physiology**, Bethesda, v. 103, n. 2, p. 524-533, aug. 2007.

BOUVET, C., et al. Sequential activation of matrix metalloproteinase 9 and transforming growth factor beta in arterial elastocalcinosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 5, p. 856-62, may. 2008.

BRIEST, W., et al. Significance of matrix metalloproteinases in norepinephrine-induced remodelling of rat hearts. **Cardiovasc Res**, 57(2), p. 379-387, 2003.

BRUDVIK, P.; RYGH, P. Multinucleated cells remove the main hyalinized tissue and start resorption of adjacent root surfaces. **Eur J. Orthod**, 16, p. 265-273, 1994.

BUCAY, N., et al. Osteoprotegerin deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. **Genes Dev**, 12, p. 1260-1268, 1998.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J. Mol Endocrinol**, v. 25, n. 2, p. 169-93, oct. 2000. ISSN 0952-5041.

BYUN, J., et al. The Efficacy of Bisphosphonates for Prevention of Osteoporotic Fracture: An Update Meta- analysis. **J. Bone Metab**, [s.l.], v. 24, p. 37-49, 2017

CAMARGOS, M. C. S.; BOMFIM, W. C. Osteoporose e Expectativa de Vida Saudável: estimativas para o Brasil em 2008. **Cad. Saúde Colet.**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p. 106-112, 2017.

CAPELOZZA FILHO, L., et al. Tratamento Ortodôntico em Adultos: uma Abordagem Direcionada. **R. Dental Press Ortodon Ortop Facial**, Maringá, v. 6, n. 5, p. 63-80, set./out. 2001.

CASTRO, M. L., et al. Downregulation of Proteinase-Activated Receptor-2, Interleukin-17, and Other Proinflammatory Genes by Subantimicrobial Doxycycline Dose in a Rat Periodontitis Model. **J. Periodontol**, v. 87, n. 2, p. 203-10, feb. 2

CASTRO, M. M., et al. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. **Atherosclerosis**, v. 198, n. 2, p. 320- 31, jun. 2008.

CASTRO, M.M., et al. Doxycycline ameliorates 2K-1C hypertension-induced vascular dysfunction in rats by attenuating oxidative stress and improving nitric oxide bioavailability. **Nitric Oxide**, 26(3), p. 162-168, 2012.

CATON, J. G., et al. Treatment with subantimicrobial dose doxycycline improves the efficacy of scaling and root planing in patients with adult periodontitis. **J. Periodontol.**,71(4), p. 521-532, 2000.

CHEN, Y.; HEIMAN, M. L. Increased weight gain after ovariectomy is not a consequence of leptin resistance. **Am. J. Physiol Endocrinol Metab**, v. 280, n. 2, feb. 2001.

CHOI, J., et al. Effects of clodronate on early alveolar bone remodeling and root resorption related to orthodontic forces: A histomorphometric analysis. **Am. J. Orthod Dentofacial Orthop**, Seoul, v. 138, p. 548, jan. 2010.

COHEN, P. R. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: implications for patients and practitioners. **Am. J. Clin Dermatol**, v. 8, n. 5, p. 259-70, 2007.

COHEN, P. R.; GROSSMAN, M. E. Management of cutaneous lesions associated with an emerging epidemic: community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 51, n. 1, p. 132-5, jul. 2004.

COMPSTON, J. Pathophysiology of atypical femoral fractures and osteonecrosis of the jaw. **Osteoporos Int**, [s.l.], v. 22, p. 2951–2961, 2011.

CONSOLARO, A.; MARTINS-ORTIZ, M. F. Um modelo experimental de movimentação dentária induzida e das reabsorções dentárias associadas. In: CONSOLARO, A. (ed.). **Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas**. Maringá: Dental Press, 2005.

CONSOLARO, A. The use of bisphosphonates does not contraindicate orthodontic and other types of treatment! **Dental Press J. Orthod**, [s.l.], v. 19, n. 4, p. 18-26, jul. 2014.

CUMMINGS, G. R.; TORABINEJAD, M. Effect of Systemic Doxycycline on Alveolar Bone Loss after Periradicular Surgery. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 6, p. 325-327, 2000.

DAVIDOVITCH Z. Tooth movement. **Critic. Rev. Oral Biol Med**, 2, p. 411-450, 1991.

DE VASCONCELLOS, L. M. R., et al. Healing of normal and osteopenic bone with titanium implant and low-level laser therapy (GaAIs): a histomorphometric study in rats. **Lasers in Medical Science**, 29(2): p. 575-580, 2014.

DUARTE, P. M., et al. Effect of an estrogen-deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. **J. Periodont. Res.**, 39, p. 107-110, 2004.

- DUARTE, P. M., et al. Estrogen and alendronate therapies may prevent the influence of estrogen deficiency on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. **J. Periodont. Res.**, 41, p. 541-546, 2006.
- DUARTE, E. C.; BARRETO, S. M. Transição demográfica epidemiológica: a Epidemiologia e Serviços de Saúde revisita e atualiza o tema. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 529-532, out./dez. 2012.
- ELOVIC, R. P.; HIPP, J. A.; HAYES, W. C. Maxillary molar extraction causes increased bone loss in the mandible of ovariectomized rats. **J. Bone Miner Res**, 10, p. 1087-1093, 1995.
- ELSTON, D. M. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 56, n. 1, p. 1-16, jan. 2007.
- EMINGIL, G., et al. The effect of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, 75(1), p 106-115, 2004.
- EMINGIL, G., et al. Adjunctive low-dose doxycycline therapy effect on clinical parameters and gingival crevicular fluid tissue plasminogen activator levels in chronic periodontitis. **Inflamm. Res.**, 55(12), p. 550-558, 2006.
- EMINGIL, G., et al. Subantimicrobial-dose doxycycline and cytokine-chemokine levels in gingival crevicular fluid. **J. Periodontol.**, 82(3), p. 452-561, 2011.
- ERIKSEN, E. F., et al. Reconstruction of the formative site in iliac trabecular bone in 20 normal individuals employing a kinetic model for matrix and mineral apposition. **Metab Bone Dis Relat. Res**, v. 5, n. 5, p. 243-52, 1984.
- FARRIS, E. J. Breeding of the rat. In: GRIFFITH, J. Q.; FARRIS, E. J. (ed.). **The rat in laboratory investigation**. New York: Hafner, 1963. p. 1-18.
- FAVUS, M. J. Editorial: Diabetes and the Risk of Osteonecrosis of the Jaw. **J. Clin Endocrinol Metab**, [s.l.], v. 92, n. 3, p. 817-818, mar. 2007.
- FLANAGAN, A. M.; CHAMBERS, T. J. Inhibition of bone resorption by bisphosphonates: interactions between bisphosphonates, osteoclasts, and bone. **Calcif. Tissue Int**, 49, p. 407-415, 1991.
- FOLWARCZNA, J.; PYTLIK, M.; JANIEC, W. Effects of doxycycline on development of changes in histomorphometric parameters of bones induced by bilateral ovariectomy in rats. **Pol J. Pharmacol**, v. 55, n. 3, p. 433-41, may.-jun. 2003.
- FRANCO, G. C., et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 activity by doxycycline ameliorates RANK ligand-induced osteoclast differentiation in vitro and in vivo. **Exp Cell Res.**, 317(10), p. 1454-1464, 2011.
- FRANZONI, J. S., et al. Zoledronic acid and alendronate sodium and the implications in orthodontic movement. **Orthod Craniofac Res**, [s.l.], p. 1-6, 2017. DOI: 10.1111/ocr.12192.

FREITAS, N.R., et al. Bisphosphonate treatment and dental implants: a systematic review. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, [s.l.], v. 21, n. 5. p. 644-651, set. 2016.

FUJIMURA, Y., et al. Influence of bisphosphonates on orthodontic tooth movement in mice. **European Journal of Orthodontics**, [s.l.], v. 31, p. 572–577, 2009.

GAMEIRO, G. H., et al. Nouer DF, Pereira Neto JS, Siqueira VC, Andrade ED, Novaes PD, Veiga MCF. Effects of short- and long-term celecoxib on orthodontic tooth movement. **Angle Orthod**, 78, p. 860-865, 2008.

GHONEIMA, A. A., et al. Bisphosphonates treatment and orthodontic considerations. **Orthod Craniofac Res.**, [s.l.], v. 13, p. 1-10, 2010.

GOLUB, L. M., et al. Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. **Journal of Periodontal Research**, 18, p. 516-526, 1993.

GOLUB, L. M., et al. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. **J. Clin Periodontol**, v. 22, n. 2, p. 100-9, feb. 1995.

GOLUB, L. M., et al. Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis. **J. Clin Periodontol**, 28(2), p.146-56, 2001.

GOMES, K. D. N., et al. Doxycycline induces bone repair and changes in Wnt signalling. **International journal of oral science**, Chengdu, v. 9, n. 3, p. 158-166, sep. 2017.

GOVINDARAJAN, P., et al. Implications of combined ovariectomy and glucocorticoid (dexamethasone) treatment on mineral, microarchitectural, biomechanical and matrix properties of rat bone. **International journal of experimental pathology**, v. 94, n. 6, p. 387-98, dec. 2013.

GREENWALD, R. A., et al. In vitro sensitivity of the three mammalian collagenases to tetracycline inhibition: relationship to bone and cartilage degradation. **Bone**, v. 22, n. 1, p. 33-8, jan. 1998.

GRIFFIN, M. O., et al. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 299, n. 3, p. C539-C548, 2010.

GUIMARAES, D. A., et al. Doxycycline dose-dependently inhibits MMP-2-mediated vascular changes in 2K1C hypertension. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 108(5), 2011.

GÜRKAN, A., et al. Post-treatment effects of subantimicrobial dose doxycycline on clinical parameters and gingival crevicular fluid transforming growth factor-beta1 in severe, generalized chronic periodontitis. **Int J. Dent Hyg**, 6(2), p. 84-92, 2008.

- HAFFAJEE, A. D.; PATEL, M.; SOCRANSKY, S. S. Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis. **Oral Microbiol Immunol**, 23(2), p. 148-157, 2008.
- HASHIMOTO, M., et al. The effect of bone morphometric changes on orthodontic tooth movement in an osteoporotic animal model. **Angle Orthod**, [s.l.], v. 83, n. 5, p. 766-773, feb. 2013.
- HELLER, I. J.; NANDA, R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement: an experimental study. **American Journal of Orthodontics**, 75, p. 239-258, 1979.
- HERNANDES, L., et al. Densitometry, radiography, and histological assessment of collagen as methods to evaluate femoral bones in an experimental model of osteoporosis. **Osteoporos Int**, 2011.
- HSIEH, Y. D.; DEVLIN, H.; MCCORD, F. The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat. **Arch Oral Biol**, 40, p. 529-531, 1995.
- HSU, H., et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. **Proc Natl Acad Sci USA**, p. 3540-3545, 1999.
- HSU, E.; PACIFICI, R. From osteoimmunology to osteomicrobiology: how the microbiota and the immune system regulate bone. **Calcified tissue international**, Berlin, oct. 2018.
- HUGHES, D. E., et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. **J. Bone Miner Res**, 10, p. 1478-1487, 1995.
- IGARASHI, K., et al. Anchorage and retentive effects of a bisphosphonate (AHBuBP) on tooth movements in rats. **Am J. Orthod Dentofacial Orthop**, 106, p. 279-289, 1994.
- ISSA, J. P. M., et al. The effect of simvastatin treatment on bone repair of femoral fracture in animal model. **Growth Factors**, 33(2), p. 139-148, 2015.
- JAHANGIRI, L.; KIM, A.; NISHIMURA, I. Effect of ovariectomy on the local residual ridge remodeling. **J. Prosthet Dent**, 77, p. 435-443, 1997.
- JEE, W. S.; YAO, W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. **J. Musculoskelet Neuronal Interact**, 1(3), p. 193-207, 2001.
- JOHNELL, O.; KANIS, J. A. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. **Osteoporosis international**, London, v. 17, n. 12, p. 1726-33, dec. 2006.
- JOHNSON, R. B.; WOOD, N.; SERIO, F. G. Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal disease. **J. Periodontol.**, 75(1), p. 37-43, 2004.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Citologia básica*. Koogan, 2008.

- KAIPATUR, N. R., et al. Impact of bisphosphonate drug burden in alveolar bone during orthodontic tooth movement in a rat model: a pilot study. **Am. J. Orthod Dentofacial Orthop**, [s.l.], v. 144, n. 4, p. 557-562, jun. 2013.
- KARRAS, J.C., et al. Effect of alendronate on orthodontic tooth movement in rats. **Am. J. Orthod Dentofacial Orthop**, [s.l.], v. 136, n. 6, p. 843-847, dez. 2009.
- KHASTGIR, G., et al. Anabolic effect of estrogen replacement on bone in postmenopausal women with osteoporosis: Histomorphometric evidence in a longitudinal study. **J. Clin Endocrinol Metal**, 86, p. 289-295, 2001.
- KIMMEL, D. B. Mechanisms of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen containing biphosphonates. **J. Dent Res**, 86, p. 1022-1033, 2007.
- KIMURA, M., et al. The Obesity in Bilateral Ovariectomized Rats Is Related to a Decrease in the Expression of Leptin Receptors in the Brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, n. 4, p. 1349-1353, 2002.
- KINANE, D. F., et al. Working Group 2 of Seventh European Workshop on Periodontology. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **J. Clin Periodontol.**, 38 Suppl 11, p. 44-48, 2011.
- KRIEGER, E., et al. Current state of orthodontic patients under Bisphosphonate therapy. **Head & Face Medicine**, [s.l.], v. 9, n. 10, p. 1-6, 2013.
- KRISHNAN, S.; PANDIAN, S.; KUMAR, A. Effect of bisphosphonates on orthodontic tooth movement - an update. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, [s.l.], v. 9, n. 4, p. ZE01-ZE05, apr. 2015.
- KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. **Am. J. Orthod Dentofacial Orthop**, [s.l.], v. 129, p. 469, 2006.
- KUTAN, E., et al. Efficacy of doxycycline release collagen membrane on surgically created and contaminated defects in rat tibiae: A histopathological and microbiological study. **Arch Oral Biol**, v. 63, p. 15-21, mar. 2016.
- LACEY, D. L., et al. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell**, 93, p. 165-176, 1998.
- LANZA, F., et al. The Upper GI Safety and Tolerability of Oral Alendronate at a Dose of 70 Milligrams Once Weekly: A Placebo- Controlled Endoscopy Study. **Am. J. Gastroenterol**, [s.l.], v. 97, n. 1, p. 58-64, 2002.
- LERNER, U. H. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. **J. Dent Res.**, 85, p. 584-595, 2006.
- LEWANDROWSKI, K.-U., et al. Improved osteoinduction of cortical bone allografts: A study of the effects of laser perforation and partial demineralization. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 15, n. 5, p. 748-756, 1997.

- MACEDO, A. P., et al. Influence of treadmill training on bone structure under osteometabolic alteration in rats subjected to high-fat diet. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 27, n. 2, p. 167-176, 2017.
- MAGANZINI, A. L.; WONG, A. M.; AHMED, M. K. Forces of various nickel titanium closed coil springs. **Angle Orthod**, 80, p. 182-187, 2010.
- MALTAGLIATI, L. A.; MONTES, L. A. P. Análise dos fatores que motivam os pacientes adultos a buscarem o tratamento ortodôntico. **R. Dental Press Ortodon Ortop Facial**, Maringá, v. 12, n. 6, p. 54-60, nov./dez. 2007.
- MARTIN, R. M.; CORREA, P. H. Bone quality and osteoporosis therapy. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 54, n. 2, p. 186-99, mar. 2010.
- MARX, R.E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J. Oral Maxillofac Surg**, [s.l.], v. 61, p. 1115-1118, 2003.
- MAVRAGANI, M.; BRUDVIK, P.; SELVIG, K. A. Orthodontically induced root and alveolar bone resorption: inhibitory effect of systemic doxycycline administration in rats. **European Journal of Orthodontics**, v. 27, n. 3, p. 215-225, 2005.
- MAZZIEIRO, E. T. **Bisfosfonato e movimentação dentária induzida: Avaliação microscópica de seus efeitos**. 1999. 154 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- MITAZAKI, S., et al. Apocynin reduced doxycycline-induced acute liver injury in ovariectomized mice. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 357-363, 2016.
- MONTEIRO, L. O., et al. Effect of treatment with simvastatin on bone microarchitecture of the femoral head in an osteoporosis animal model. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, n. 8, p. 684-690, 2016.
- MOYERS, R. E.; BAUER, J. L. The periodontal response to various tooth movements. **Am. J. Orthod.**, 36(8), p. 572-580, aug. 1950.
- MOYERS, R. E. **Ortodontia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
- NAKANO, T., et al. Effects of different types of tooth movement and force magnitudes on the amount of tooth movement and root resorption in rats. **Angle Orthod**, [s.l.], v. 84, n. 6, p. 1079-1085, 2014.
- NAKAS, E., et al. Dose and time dependant effects of clodronate on orthodontic tooth movement. **Bosn J. Basic Med Sci**, [s.l.], v. 17, n. 1, p. 23-28, 2017.
- NEWMAN, E.; TURNER, A. S.; WARK, J. D. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. **Bone**, 16, p. 277-284, 1995.

NOCITI, F. H., et al. Effect of estrogen replacement and calcitonin therapies on bone around titanium implants placed in ovariectomized rats: a histometric study. **Int J. Oral Maxillofac Implants**, 17, p. 786-792, 2002.

NOVAK, M. J., et al. Combining host modulation and topical antimicrobial therapy in the management of moderate to severe periodontitis: a randomized multicenter trial. **J. Periodontol**, 79(1), p. 33-41, 2008.

NOVAK, M. J., et al. Adjunctive benefits of subantimicrobial dose doxycycline in the management of severe, generalized, chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, 73(7), p. 762-769, 2002.

ODA, T.; YOSHIE, H.; YAMAZAKI, K. Porphyromonas gingivalis antigen preferentially stimulates T cells to express IL-17 but not receptor activator of NF-kappaB ligand in vitro. **Oral Microbiol Immunol.**, 18(1), p. 30-36, 2003.

OHNO, K., et al. Computational Insights into Binding of Bisphosphates to Farnesyl Pyrophosphate Synthase. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 18, n. 2, p. 220-233, 2011.

ORWOLL, E., et al., Alendronate for the treatment of osteoporosis in men. **N Engl J. Med**, 343(9), p. 604-610, 2000.

PAIVA-FONSECA, F., et al. Alendronate-associated osteonecrosis of the jaws: A review of the main topics. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, 19(2), p. 106-111, 2014.

PAYNE, J. B., et al. Subantimicrobial dose doxycycline effects on alveolar bone loss in post- menopausal women. **J. Clin Periodontol**, v. 34, n. 9, p. 776-87, sep. 2007.

PELLE, M. T.; CRAWFORD, G. H.; JAMES, W. D. Rosacea: II. Therapy. **J. Am Acad Dermatol**, v. 51, n. 4, p. 499-512, oct. 2004.

PEREIRA, A. A. C.; TAVEIRA, L. A. A. Movimentação dentária induzida e ovariectomia: avaliação microscópica. **Rev FOB**, 8, p. 1-7, 2000.

PINNEY, J. R., et al. Imaging longitudinal changes in articular cartilage and bone following doxycycline treatment in a rabbit anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 30, n. 2, p. 271-282, 2012.

PORTER, G. The Norway rat (*Rattus norvegicus*). In: Lanne-Petter W, Worden NA, editors. **The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals**. 3. ed. London: Livingstone, p. 353-90, 1967.

PRESHAW, P. M., et al. Subantimicrobial dose doxycycline enhances the efficacy of scaling and root planing in chronic periodontitis: a multicenter trial. **J. Periodontol**, 75(8), p. 1068-1076, 2004.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, 21(6), p. 775-7, 2005.

- REN, Y.; MALTHA, J. C.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M. Optimum force magnitude for orthodontic tooth movement: a systematic literature review. **Angle Orthod**, 73, p. 86-92, 2003.
- RIGGS, B. L.; MELTON, L. J., 3RD. Involutional osteoporosis. **N Engl J. Med**, v. 314, n. 26, p. 1676-86, jun. 1986.
- RINCHUSE, D. J., et al. Orthodontic treatment of patients using bisphosphonates: A report of 2 cases. **Am J. Orthod Dentofacial Orthop**, 131, p. 321-26, 2007.
- ROBERTS, M. C. Tetracycline therapy: update. **Clin Infect Dis.**, 36(4), p. 462-467, 2003.
- RODAN, G. A.; FLEISCH, H. A. Bisphosphonates: mechanisms of action (Perspectives). **J. Clin Invest**, 97, p. 2692-2696, 1996.
- RODAN, G. A. Bisphosphonates: mechanisms of action. **Endocr Rev**, 19, p. 80- 100, 1998.
- ROGERS, A.; EASTELL, R. Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. **J. Clin Endocrinol Metab**, 90, p. 6323-6331, 2005.
- ROSEN, C. J.; BILEZIKIAN, J. P. Anabolic therapy for osteoporosis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 86, p. 957-964, 2001.
- ROSINI, S.; ROSINI, S.; BERTOLDI, I.; FREDIANI, B. Understanding bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: uses and risks. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, [s.l.], v. 19, p. 3309-3317, 2015.
- RUSSEL, R. G. G.; ROGERS, M. J. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. **Bone**, 25, p. 97-106, 1999.
- RUSSEL, R.; WATTS, N.B.; EBETINO, F.H.; ROGERS, M.J. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. **Osteoporos Int**, [s.l.], v. 19, n. 6, p. 733-759, 2008.
- RYGH, P. Orthodontic root resorption studied by electron microscopy. **Angle Orthod**, v. 47, n. 1, p. 1- 16, jan. 1977.
- SALAZAR, M., et al. Effect of teriparatide on induced teeth displacement in ovariectomized rats: a histomorphometric analysis. **Am. J. Orthod Dentofacial Orthop**, 139, p. 337-344, 2011.
- SALAZAR, M., et al. **Quantitative PCR**. CSH Protoc., 2006.
- SHADDOX, L. M., et al. Local inflammatory markers and systemic endotoxin in aggressive periodontitis. **J. Dent Res.**, 90(9), p. 1140-1144, 2011.
- SHAHABOOEI, M., et al. A histomorphometric study of the effect of doxycycline and erythromycin on bone formation in dental alveolar socket of rat. **Advanced Biomedical Research**, v. 4, p. 71, 2015.

SHIMA, K., et al. Inflammatory Effects of Nitrogen-Containing Bisphosphonates (N-BPs): Modulation by Non-N-BPs. **Biol Pharm Bull**, [s.l.], v. 40, n. 1, p. 25-33, 2017.

SHIMANO, A.C.; VOLPON, J. B.; Lima, R. S. **Ação do Treinamento Físico Antes e Após a Instalação da Osteopenia de Ratas Ovariectomizadas**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

SHIMANO, R. C., et al. Biomechanical and microstructural benefits of physical exercise associated with risedronate in bones of ovariectomized rats. **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n. 6, p. 431-438, 2014.

SHIMIZU, M., et al. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats: quantitative backscattered electron image analysis. **Anat. Rec.**, 259, p. 76-85, 2000.

SHIMIZU, M., et al. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats. **J. Electron. Microsc.**, 47, p. 517-526, 1995.

SHIRAI, H., et al. Effect de calcium supplementation on bone dynamics of the maxilla, mandible and proximal tibia in experimental osteoporosis. **Journal of Oral Rehabilitation**, 29, p. 287-294, 2001.

SIMONET, W.S., et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell**, 89, p. 309-319, 1997.

SIRISOONTORN, I., et al. Orthodontic tooth movement and root resorption in ovariectomized rats treated by systemic administration of zoledronic acid. **Am. J. Orthod Dentofacial Orthop**, [s.l.], v. 141, n. 5, p. 563-573, 2012.

SKIDMORE, R., et al. Effects of subantimicrobial-dose doxycycline in the treatment of moderate acne. **Arch Dermatol.**, v. 139, n. 4, p. 459-64, apr. 2003.

SORSA, T., et al. Collagenase-2 (MMP-8) as a point-of-care biomarker in periodontitis and cardiovascular diseases. Therapeutic response to non-antimicrobial properties of tetracyclines. **Pharmacol Res**, v. 63, n. 2, p. 108-13, feb. 2011.

SORSA, T.; TJADERHANE, L.; SALO, T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. **Oral Dis**, v. 10, n. 6, p. 311-8, nov. 2004.

SVENSSON, H. K., et al. A painful, never ending story: older women's experiences of living with an osteoporotic vertebral compression fracture. **Osteoporos Int**, [s.l.], v. 27, p. 1729-1736, 2016.

TAKAHASHI, K., et al. The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. **J. Clin Periodontol.**, 32(4), p. 369-374, 2005.

TAN, K. R., et al. Doxycycline for Malaria Chemoprophylaxis and Treatment: Report from the CDC Expert Meeting on Malaria Chemoprophylaxis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 4, p. 517-531, apr. 2011.

TEITELBAUM, S. L. Bone Resorption by Osteoclasts. *Science*, v. 289, n. 5484, p. 1504-1508, sep. 2000.

- TANAKA, M., et al. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. **J. Periodont. Res.**, 37, p. 161-165, 2001.
- TANAKA, M., et al. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. **J. Periodont. Res.**, 37, p. 161-165, 2002.
- TELLA, E., et al., The Effect of Systemic Delivery of Aminoguanidine versus Doxycycline on the Resorptive Phase of Alveolar Bone Following modified Widman Flap in Diabetic Rats: A Histopathological and Scanning Electron Microscope (SEM) study. **Int. J. Health Sci (Qassim)**, 8(3), p. 275-285, 2014.
- TEÓFILO, J. M.; BRENTGANI, L. G.; LAMANO-CARVALHO, T. L. **Bone healing in Arch Oral Biol**, 49, p. 755-762, 2004.
- THARAPPEL, J. C., et al. Doxycycline shows dose-dependent changes in hernia repair strength after mesh repair. **Surg Endosc**, 30(5), p. 2016-2021, 2016.
- THEILL, L. E.; BOYLE, W. J.; PENNINGER, J. M. RANK-Land RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. **Annu Rev Immunol**, 20, p. 795-823, 2002.
- THOMAS, J.; WALKER, C.; BRADSHAW, M. Long-Term Use of Subantimicrobial Dose Doxycycline Does Not Lead to Changes in Antimicrobial Susceptibility. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 9, p. 1472-1483, 2000.
- VENKATARAMANA, V., et al. Impact of Bisphosphonate on Orthodontic tooth movement and osteoclastic count: An Animal Study. **Journal of International Oral Health**, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 1-8, 2014.
- VOLPON, J. B., et al. O alendronato de sódio na prevenção da osteopenia secundária à imobilização gessada, em ratas: avaliação histomorfométrica. **Revista Brasileira de Ortopedia**, 43, p. 442-451, 2008.
- VON BOHL, M.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M. Hyalinization during orthodontic tooth movement: a systematic review on tissue reactions. **European Journal of Orthodontics**, [s.l.], v. 31, p. 30-16, 2009.
- WALKER, C., et al. Subantimicrobial dose doxycycline effects on osteopenic bone loss: microbiologic results. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 8, p. 1590-601, aug. 2007.
- WRONSKI, T.J., Cintron, M. and L.M. Dann. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. **Calcif Tissue Int**, 43(3), p. 179-183, 1988.
- WRONSKI, T.J., et al. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. **Calcif Tissue Int**, 45(6), p. 360-366, 1989.
- YONEDA N, Saito S., et al. The influence of ovariectomy on ob gene expression in rats. **Horm Metab Res**, 30, p. 263-265, 1998.
- ZAHROWSKI, J. J. Bisphosphonate treatment: An orthodontic concern calling for a proactive approach. **Am. J. Orthod Dentofacial Orthop**, 131, p. 311-320, 2007.
- ZOGRAFOS, G. N., et al. Drug-induced esophagitis. **Diseases of the Esophagus**, [s.l.], v. 22, p. 633-637, 2009.