



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ORTODONTIA

**ARIANE XIMENES GRACIANO PARRA**

**EFEITO DA ISOTRETINOÍNA NA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA  
INDUZIDA EM RATOS**

**CURITIBA**

**2017**

**ARIANE XIMENES GRACIANO PARRA**

**EFEITO DA ISOTRETINOÍNA NA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA  
INDUZIDA EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Odontologia, Área de Concentração em Ortodontia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Souza Camargo.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Trindade Grégio.

**CURITIBA**

**2017**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central  
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB 9/1118

Parra, Ariane Ximenes Graciano

P259e      Efeito da isotretinoína na movimentação dentária induzida em ratos / Ariane  
2017      Ximenes Graciano Parra ; orientadora: Elisa Souza Camargo ; coorientadora:  
Ana Maria Trindade Grégio. – 2017.  
52 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,  
2017

Inclui bibliografias

1. Ortodontia. 2. Isotretinoína. 3. Movimentação dentária. 4. Remodelação  
óssea. I. Camargo, Elisa Souza. II. Grégio, Ana Maria Trindade. III. Pontifícia  
Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em  
Odontologia. IV. Título.

CDD 20. ed. – 617.643



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Escola de Ciências da Vida  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia


TERMO DE APROVAÇÃO


ARIANE XIMENES GRACIANO PARRA


EFEITO DA ISOTRETINOÍNA NA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS

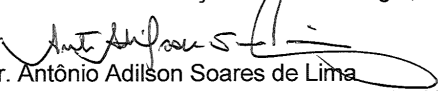
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Doutor em Odontologia**, Área de Concentração em **Ortodontia**.


Orientador (a):

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisa Souza Camargo  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

  
Prof. Dr. Odilon Guariza Filho  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aline Cristina Batista Rodrigues Johann  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

  
Prof. Dr. Antônio Adilson Soares de Lima  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR

  
Prof. Dr. José Vinícius Bolognese Maciel  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFRJ

Curitiba, 08 de dezembro de 2017.

*“À **Deus**, por sua presença sempre em tudo.*

*Por me abençoar em todos os momentos da minha vida”.*

*“Ao meu marido **Andreo**, por todo amor dedicado a mim e incentivo para a realização deste doutorado. Obrigada por todo apoio, paciência, respeito e cumplicidade. Por dividir comigo os momentos de dificuldades e as realizações, meu companheiro de caminhada, te amo pra sempre”.*

*“À minha filha **Lívia**, minha benção de Deus que está a caminho, e ainda no meu ventre tem participado ativamente desta etapa final. Já te amo infinitamente minha princesa”.*

*“Aos meus pais **Paulo e Myriam**, por todo amor e apoio, por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui. Meus grandes exemplos, obrigada por todo ensinamento e por serem meu porto seguro sempre”.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Souza Camargo, por todo conhecimento transmitido, oportunidade de aprendizado, paciência, incentivo e carinho. Por ser um exemplo de profissional e uma pessoa admirável. Muito obrigada por tudo.

Aos meus irmãos, Lorena e Rafael, e à minha sobrinha Luíza, pela presença ao longo da minha caminhada. Por serem a melhor família que eu poderia ter.

Aos Constituintes da Banca Examinadora, pelas considerações realizadas e por acrescentarem conhecimento e informações importantes com extrema competência e atenção.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Trindade Grégio, pela co-orientação deste trabalho. Obrigada pelos preciosos conhecimento e tempo destinados.

Ao Prof. Dr. Odilon Guariza Filho, pela transmissão de seus valiosos conhecimentos e por seu admirável entusiasmo e amor ao ensinar Ortodontia.

Ao Prof. Dr. Orlando Motohiro Tanaka, por contribuir imensamente na minha formação profissional, e por ser exemplo de dedicação e perseverança.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Cristina Batista Rodrigues Johann, pelas considerações e sugestões para a realização deste trabalho.

Aos alunos de PIBIC Maycon Fernando da Silva Cortarelli e Isteicy Cortêz Silva, por toda dedicação e auxílio durante a pesquisa.

Ao Senhor Cândido José Thomaz Pereira, Rafael Zoez e demais funcionários do Biotério da PUCPR.

Aos auxiliares do Laboratório da Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da PUCPR, Misael Gomes Barbosa e Álvaro Roberto Gonçalves Machado, pela dedicação e colaboração destinadas a fase experimental desta pesquisa.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Experimental Ana Paula Martins, Marina Azevedo e Seigo Nagashima por todo auxílio e colaboração na realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Sérgio Aparecido Ignácio pela análise estatística dos dados da presente tese. Obrigada por toda a sua dedicação para com o Programa de Pós-Graduação de Odontologia dessa instituição.

Ao Instituto Lamir da Universidade Federal do Paraná, pela realização das micro-tomografias, e em especial ao funcionário Thiago Gomes da Silva, pela sua paciência ao me ensinar a utilizar os softwares durante a análise destes exames.

À secretária Neide Reis Borges pelo primor em realizar o seu trabalho junto ao Programa de Pós – Graduação em Odontologia da PUCPR.

Aos funcionários da Clínica de Odontologia da PUCPR.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, onde tive o prazer de estudar durante quatro anos para a realização deste doutorado.

À todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

*"O saber é saber que nada se sabe.*

*Essa é a definição do verdadeiro conhecimento".*

*- Confúcio*



## SUMÁRIO

<b>ARTIGO EM PORTUGUÊS.....</b>	<b>1</b>
Página título.....	2
Resumo.....	3
Introdução.....	4
Material e Métodos.....	5
Resultados.....	11
Discussão.....	15
Conclusões.....	19
Referências.....	20
<b>ARTIGO EM INGLÊS.....</b>	<b>24</b>
Title page.....	25
Abstract.....	26
Introduction.....	27
Material and Methods.....	28
Results.....	33
Discussion.....	38
Conclusions.....	42
References.....	42
<b>ANEXO.....</b>	<b>46</b>
Anexo I – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	47
Anexo II – Metodologia complementar.....	48
Anexo III – Normas para publicação – <i>American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics</i> .....	49

**ARTIGO EM PORTUGUÊS**

## **PÁGINA TÍTULO**

### **EFEITO DA ISOTRETINOÍNA NA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS**

**Ariane Ximenes Graciano Parra**, CD, MsC

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

Escola de Ciências da Vida

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Ortodontia

E-mail: [arianeximenes@hotmail.com](mailto:arianeximenes@hotmail.com)

**Ana Maria Trindade Grégio**, CD, PhD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

Escola de Ciências da Vida

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Estomatologia e Biociências

E-mail: [ana.gregio@pucpr.br](mailto:ana.gregio@pucpr.br)

**Elisa Souza Camargo**, CD, PhD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

Escola de Ciências da Vida

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Ortodontia

E-mail: [escamargo@uol.com.br](mailto:escamargo@uol.com.br)

#### **Endereço para correspondência**

**Aline Cristina Batista Rodrigues Johann**

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

Escola de Ciências da Vida

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Estomatologia

Rua: Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho

CEP: 80215-901 Curitiba, Paraná, Brasil

Fone: 41 3271-1637/Fax 41 3271-1405

E-mail: [aline.johann@pucpr.br](mailto:aline.johann@pucpr.br)

## RESUMO

**Introdução:** Avaliar o efeito da isotretinoína no deslocamento dentário e nos tecidos relacionados ao movimento dentário induzido (MDI) em ratos. **Métodos:** Foram utilizados 163 ratos *Wistar*, divididos aleatoriamente em quatro grupos: O (n=40), óleo vegetal; I (n=40), 7,5 mg/kg de isotretinoína; OM (n=44), óleo vegetal e MDI e IM (n=39), 7,5 mg/kg de isotretinoína e MDI. Após o 30º dia de aplicação das soluções, instalou-se o dispositivo ortodôntico que movimentou o primeiro molar superior direito para mesial (30 cN) em OM e IM. Os animais foram mortos 2, 7, 14 e 21 dias após a colocação dos dispositivos. Os animais dos grupos O e I não foram submetidos ao MDI, mas foram mortos nos mesmos intervalos de tempo. Avaliou-se o deslocamento dentário, a neoformação de colágeno tipo I pela coloração picrossírius, a reabsorção óssea e radicular por meio da coloração fosfatase ácida tartarato-resistente, a presença de áreas hialinas pela coloração hematoxilina e eosina, e o trabeculado ósseo por micro-tomografia computadorizada. Os dados foram analisados pelos testes estatísticos ANOVA, Games-Howell, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e Dunn, ao nível de significância de 5%. **Resultados:** Não houve diferença no deslocamento dentário nos grupos OM e IM em todos os períodos testados ( $P > 0,05$ ). Não houve diferença no número de osteoclastos, presença de áreas hialinas, volume trabecular, espessura trabecular, separação trabecular e número trabecular entre os grupos O, I, OM e IM em todos os períodos testados ( $P > 0,05$ ). Observou-se menor porcentagem de colágeno tipo I em IM comparado a OM no 7º dia ( $P < 0,05$ ). Observou-se menor frequência de áreas de reabsorção radicular no grupo IM no 2º e no 21º dia comparado ao OM ( $P < 0,05$ ). **Conclusões:** O uso da isotretinoína 7,5 mg/kg não interferiu no deslocamento dentário, no processo da neoformação do colágeno, na reabsorção óssea, na presença de áreas hialinas e na microarquitetura óssea. Diminuiu a presença de reabsorção radicular em ratos submetidos ao MDI.

**Palavras-chave:** Isotretinoína; Técnicas de movimentação dentária; Remodelação óssea

## INTRODUÇÃO

A acne é a doença de pele que mais acomete os adolescentes, sendo que sua prevalência é de 80 a 90%.<sup>1</sup> Um estudo realizado com indivíduos Americanos mostrou que 12,1% dos adolescentes com 17 anos de idade apresentam acne severa.<sup>2</sup> A isotretinoína ou ácido 13-cis-retinóico é o fármaco de escolha para o tratamento desta doença e sua utilização é expressiva entre os adolescentes e adultos jovens.<sup>1,3-5</sup>

A isotretinoína é derivada da vitamina A e começou a ser comercializada em 1982.<sup>3</sup> O alto consumo da isotretinoína pode causar muitos efeitos colaterais, semelhantes aos da hipervitaminose A.<sup>6-9</sup> Estudos revelam que a vitamina A antagoniza a ação da vitamina D,<sup>7,9-12</sup> pois ambas necessitam da mesma proteína ligante, os receptores X-retinóicos, para realizar sua atividade de transcrição.<sup>12</sup> Sendo assim, altas doses de vitamina A podem causar efeitos colaterais sobre os ossos.<sup>7,9-12</sup>

O movimento dentário induzido (MDI) ocorre pela aplicação de forças biomecânicas sobre os dentes. Essa ação gera um processo biológico múltiplo, caracterizado por reações sequenciais em duas regiões do tecido periodontal: a área de compressão e a área de tensão.<sup>13</sup> Nas modificações teciduais induzidas, ocorre remodelação tecidual por ativação da reabsorção óssea alveolar na área de compressão e consequente aposição óssea na área de tensão.<sup>14,15</sup> A presença sistêmica de alguns fármacos pode alterar as reações biológicas relacionadas ao MDI.

Efeitos colaterais causados pela isotretinoína sobre o tecido ósseo têm sido relatados, como a redução da densidade mineral óssea,<sup>6,11,16</sup> a calcificação dos tendões e ligamentos,<sup>9</sup> o aumento da reabsorção óssea, do número e tamanho dos osteoclastos, e alterações na diferenciação dos osteoblastos.<sup>17,18</sup> Estudos mostraram que não houve diferença na densidade mineral óssea em pacientes tratados com isotretinoína 1mg/Kg/dia.<sup>19,20</sup> O tempo de tratamento e a dose de isotretinoína utilizada parecem influenciar na sua ação sobre o tecido ósseo.<sup>7,21,22</sup>

Outros autores encontraram aceleração do processo de reparo ósseo alveolar após a extração dentária em ratos.<sup>23,24</sup> Foi avaliado o uso da isotretinoína sobre o MDI,<sup>23</sup> entretanto não avaliou-se reabsorção radicular e área hialina como no

presente estudo. Algumas evidências mostram que a presença da isotretinoína pode alterar o metabolismo ósseo; entretanto, faltam estudos conclusivos sobre sua atuação no MDI. Dessa forma, o presente estudo avaliou o deslocamento dentário, a neoformação do colágeno, a reabsorção óssea e radicular, a presença de áreas hialinas e a microarquitetura óssea em ratos submetidos ao MDI e uso da isotretinoína. Não foram encontrados estudos que avaliaram os mesmos aspectos considerados no presente estudo.

Diante das alterações que a isotretinoína pode causar no tecido ósseo, e considerando o uso expressivo desse medicamento principalmente entre os adolescentes e adultos jovens, que representam a maioria dos pacientes que realizam tratamento ortodôntico, faz-se necessária a investigação da possibilidade de ação da isotretinoína sobre o movimento dentário induzido.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostra**

Esta pesquisa teve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) e registrada sob parecer nº 935 (Anexo I, página 47).

Foram utilizados 163 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com 6 a 8 semanas de vida, pesando aproximadamente 200g, provenientes e mantidos pelo Biotério da PUCPR.

Os animais foram mantidos em temperatura controlada entre 19°C e 22°C e fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro. Foram fornecidos água e ração triturada *ad libitum*. Com o objetivo de ajustar a dosagem do fármaco, os animais foram pesados no início do experimento e semanalmente até o dia da eutanásia por meio de uma balança eletrônica de precisão (Gehaka – BG 4001, São Paulo, Brasil).

Dividiu-se os animais aleatoriamente em quatro grupos: O (n=40), óleo vegetal; I (n=40), isotretinoína; OM (n=44), óleo vegetal e MDI; e IM (n=39), isotretinoína e MDI. Nos grupos O e OM, os animais receberam 0,5 ml de óleo vegetal por gavagem, uma vez ao dia. Nos grupos I e IM foram realizadas aplicações de 7,5mg/kg de isotretinoína uma vez ao dia.

O óleo vegetal e a isotretinoína foram obtidos no Laboratório Farmacêutico da PUCPR, Curitiba, Brasil. A isotretinoína foi obtida na forma farmacêutica de pó, mediante apresentação de receita controlada e especial para o medicamento. O pó da isotretinoína foi armazenado em embalagem escura e refrigerada, e cada suspensão foi preparada imediatamente antes da administração, em função da alta sensibilidade do medicamento à luz e ao calor.

No momento da administração da isotretinoína, nos grupos I e IM, o pó do medicamento era diluído em óleo vegetal de acordo com o peso do animal, com auxílio de seringa dosadora de 10 ml, até alcançar a dosagem de 7,5 mg/Kg. O frasco dessa solução era agitado e a solução era imediatamente administrada por gavagem. A dosagem e a via de administração da isotretinoína foram escolhidas de acordo com os estudos de Ferguson et al,<sup>21</sup> Bergoli et al<sup>24</sup> e Oliveira et al.<sup>25</sup>

## **Experimento**

As administrações das soluções foram feitas em todos os grupos durante 30 dias, de acordo com o estudo de Ribeiro et al.<sup>26</sup> No 30º dia, os animais dos grupos OM e IM foram sedados com Tiletamina e Zolazepan (Zoletil, Virbac Brasil Indústria e Comércio LTDA, Jurubatuba, Brasil) 50 mg/kg, via intraperitoneal. Instalou-se o dispositivo ortodôntico para induzir o MDI de acordo com o modelo utilizado por Ribeiro et al,<sup>26</sup> consistindo de uma mola fechada de níquel-titânio (G&H Wire, Franklin, IN), fixada no primeiro molar superior direito com fio de amarrilho inox 0,025” (Morelli, São Paulo, Brasil) posicionado na região mais cervical do dente, e ligado aos incisivos centrais superiores (também na região mais cervical), provocando o movimento mesial do primeiro molar (Figs 1 e 2, Anexo II, página 48). A força recíproca produzida pela mola fechada era de 30 cN, padronizada através de um tensiomêtro (Haag - Streit AG, Koeniz, Suíça). Para garantir maior estabilidade da mola, os incisivos inferiores foram desgastados e os incisivos superiores unidos com resina composta Charisma (Heraeus, Hanau, Alemanha). Após a instalação, a mola não era reativada; no entanto, seu posicionamento foi conferido diariamente.

A administração das soluções continuou e os animais foram mortos por overdose anestésica (Ketamina 270mg/kg e Xilazina 30mg/kg, via intraperitoneal), no 32º, 37º, 44º, e 51º dias, correspondentes ao 2º, 7º, 14º, e 21º de MDI, ou seja, após a colocação dos dispositivos. Os animais dos grupos O e I, os quais não foram submetidos ao MDI, foram mortos nos mesmos intervalos de tempo.

### **Deslocamento dentário**

O deslocamento dentário mensurado em milímetros (Deslocamento dentário = medida final - medida inicial) foi aferido com paquímetro digital (Absolute; Mitutoyo, Kawasaki-Shi, Japão), posicionado entre a região mais cervical e central da face palatina do incisivo central e a região mais cervical e central da superfície mesial do primeiro molar, ambos superiores e do lado direito, nos animais dos grupos OM e IM.

### **Processamento laboratorial**

A hemimaxila direita de cada animal foi removida, dissecada, fixada em formol a 10% durante 24 horas, e descalcificada em EDTA 5% por três meses. Os espécimes foram processados e emblocados em parafina no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR. Foram obtidas 15 secções transversais a partir do terço cervical em direção apical da raiz mésio-vestibular do primeiro molar superior, cortados em micrótomo com 4 µm de espessura e com intervalo de 60 µm entre cada secção. As secções foram coradas pelas técnicas histoquímicas Picrosírius (5 secções), Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente - TRAP (5 secções) e Hematoxilina e Eosina - HE (5 secções).

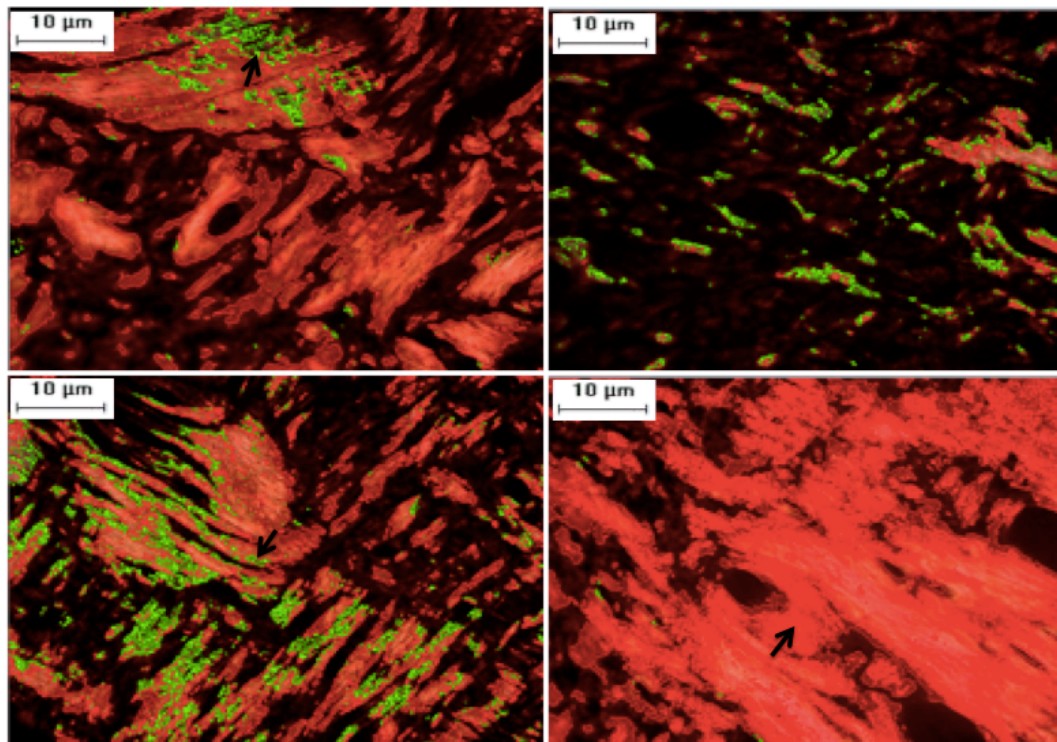
Para avaliar e comparar a microarquitetura do osso trabecular, o fêmur esquerdo dos animais foi removido, dissecado e congelado à temperatura de -20°C e posteriormente avaliado por meio de micro-tomografia computadorizada, de acordo com o estudo de Frigotto et al.<sup>27</sup>

### **Análise histológica**

Determinou-se a neoformação do colágeno por meio de microscopia de polarização, através do método histoquímico Picrosírius. A análise foi realizada por um único examinador. O osso adjacente ao ligamento periodontal (LP), na porção distal da raiz mésio-vestibular foi selecionado para análise, pois durante o MDI, o tecido ósseo é depositado na cortical alveolar na área de tração.<sup>28</sup> Também foi observado o estiramento das fibras do LP para selecionar esta área. Capturou-se uma imagem de cada secção transversal com um microscópio de luz Olympus BX-50 (Olympus, Tóquio, Japão) e lente polarizada Olympus U-Pot (Olympus, Tóquio, Japão) acoplado à microcâmera Dinolite® AM4023X (AmMo Electronics Corporation, New Taipei city 241, Taiwan), em magnificação de 200X. Com o auxílio do programa



de morfometria Image Pro-Plus 4.5.029 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD), foi quantificada a porcentagem de colágeno maduro e imaturo por meio da diferença de cores. Para isso, aplicou-se uma imagem-máscara (Fig 3), utilizada para avaliar o colágeno tipo III ou imaturo, de coloração esverdeada e com fibras mais desorganizadas e menos espessas, e colágeno tipo I ou maduro, de coloração avermelhada e com fibras mais organizadas e mais espessas.<sup>29,30</sup>



**Fig 3.** Aplicação da máscara para quantificação de colágeno tipo III (esverdeado) e tipo I (avermelhado), indicados pelas setas pretas. (Coloração de Picrosírius, magnificação 200x).

A coloração histoquímica TRAP foi realizada com o kit TRAP 387A (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO), seguindo as instruções do fabricante, para identificar osteoclastos, bem como cementoclastos, determinando assim a reabsorção óssea e do cimento, respectivamente. Para cada uma das 5 secções, capturou-se imagens de todo o ligamento periodontal da raiz méso-vestibular do primeiro molar, utilizando o mesmo microscópio de luz e microcâmera em magnificação de 40x e 400x. Os parâmetros de aquisição da imagem foram fixados durante o processo de captura. Nas imagens com magnificação de 400x, a contagem do número de osteoclastos foi realizada com auxílio do programa Image Pro-Plus 4.5.029, onde foi criada uma grade para contagem. A contagem foi

realizada por um único examinador em dois tempos, com intervalo mínimo de três semanas entre elas. A calibração do examinador foi avaliada pelo teste intra-examinador. Foram considerados osteoclastos as células multinucleadas, TRAP-positivas e localizadas no ligamento periodontal adjacente ao osso alveolar.<sup>31</sup> Nas imagens com magnificação de 40x foi mensurada a área do LP, utilizando-se a ferramenta "Create polygon feature". Para a obtenção do número de osteoclastos/micrômetros quadrados do LP, dividiu-se o número de osteoclastos pela área do ligamento periodontal. Nas imagens com magnificação de 400x foi observada a presença de áreas de reabsorção radicular, sendo considerados cementoclastos as células TRAP positivas, multinucleadas em contato ou próximas às superfícies radiculares.<sup>31</sup>

A presença de áreas hialinas foi avaliada ao longo de todo o ligamento periodontal da raiz méso-vestibular do primeiro molar superior, utilizando o mesmo microscópio de luz e microcâmara em magnificação de 40x, pelo método de coloração HE. As áreas hialinas foram definidas como alterações degenerativas do ligamento periodontal, homogêneas e livre de células.<sup>31</sup> A área hialina foi mensurada com auxílio do programa Image Pro-Plus 4.5.029, utilizando-se a ferramenta "Create polygon feature", sendo quantificada então a porcentagem de área hialina por micrômetros quadrados do LP.

A porcentagem média de colágeno tipo I, do número de osteoclastos/micrômetro quadrado do LP e do número de cementoclastos/micrômetro quadrado do LP foram obtidos pela média das cinco secções.

### **Análise micro-tomográfica**

A epífise distal do fêmur foi analisada, de acordo com o trabalho de Frigotto et al.<sup>27</sup> Foi utilizada micro-tomografia computadorizada (Bruker SkyScan 1172, Bruker, Bélgica, 2010), com voltagem de 100 kV, corrente de 100  $\mu$ A, e filtro de 0.5 mm de alumínio. As amostras foram mantidas em um porta-amostras cilíndrico, que permitiu correto alinhamento axial e estabilidade das mesmas durante a captura da imagem. Foram obtidos 200 cortes com resolução de 12,8  $\mu$ m/pixel, na área central da epífise distal de cada fêmur, através de rotação de 180° e incrementos de 0,4°. Em seguida os dados brutos foram reconstruídos através do *software* NRecon 1.6.9.3 (Bruker SkyScan 1172, Bruker, Bélgica). O volume de interesse (VOI) para análise foi

selecionado e binarizado. O osso cortical foi excluído. A análise tridimensional foi efetuada por meio do software CT Analyser 1.14.4.1 (Bruker SkyScan 1172, Bruker, Bélgica), no qual foram calculados índices morfométricos incluindo: volume trabecular (BV/TV), que corresponde ao volume ocupado pelo osso trabecular, mineralizado ou não (BV), expresso como porcentagem do volume ocupado pela medula e trabéculas ósseas (TV); espessura trabecular (Tb.Th), que determina a espessura das trabéculas ósseas; separação trabecular (Tb.Sp), que corresponde à distância entre os pontos médios das trabéculas ósseas; e número trabecular (Tb.N), que corresponde ao número de trabéculas por milímetro de tecido.<sup>32,33</sup> Devido ao alto custo para a realização da micro-tomografia em todas as amostras do estudo, foram selecionados o 7<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias de observação que correspondem às alterações teciduais e ósseas mais significativas ocorridas durante o MDI, e a fase final do MDI, respectivamente.<sup>13,15</sup>

### **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o SPSS 23.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, Ill) e Statistica 7 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK).

A verificação de normalidade e de homogeneidade de variâncias entre tratamentos (grupo x tempo) foi realizada por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, e do teste de Levene, respectivamente, ao nível de significância de 5%.

Para as variáveis contínuas, quando os testes acusaram distribuição normal e heterogeneidade de variâncias das variáveis segundo grupo e tempo, utilizou-se ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas Games-Howell para variâncias heterogêneas.

Para as variáveis contínuas, quando os testes não acusaram distribuição normal, foram utilizados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, seguidos pelo teste de comparações múltiplas não paramétricas de Dunn. Para as variáveis com escala categórica dicotômica, a análise de independência segundo grupo, tempo e interação grupo e tempo foi realizada empregando o teste Qui-quadrado. Quando houve dependência entre as variáveis ( $P < 0,05$ ), foi aplicado o teste z de diferença entre duas proporções.

A potência observada foi utilizada para calcular o poder dos testes com base no tamanho da amostra para aceitar a hipótese da diferença entre os valores médios das variáveis dependentes de acordo com grupo e tempo.

## RESULTADOS

No teste intra-examinador, o poder de reproducibilidade da contagem de osteoclastos e cementoclastos foi avaliado. O erro máximo de Dahlberg foi de 0,6947%, menor que 1%, e o coeficiente de confiabilidade foi maior que 99%, indicando que o examinador reproduziu as medidas de forma confiável.<sup>34,35</sup> O Teste *t* de *Student* revelou não haver erro sistemático na contagem, ao nível de significância de 5%.

### Deslocamento dentário

Não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) no deslocamento dentário quando se avaliou a interação grupo x tempo na comparação entre os grupos OM e IM (Tabela I).

**Tabela I.** Médias e desvios padrão (DP) do deslocamento dentário (mm) nos grupos óleo vegetal e movimento dentário induzido (OM) e isotretinoína e movimento dentário induzido (IM)

Grupo/ Tempo	OM		IM		Valor p*	Potência observada
(n)	(Média ± DP)	(n)	(Média ± DP)			
2 dias	10	0,84 ± 0,56	10	1,11 ± 0,67	0,0586	0,7572
7 dias	10	1,58 ± 0,58	10	0,90 ± 0,44		
14 dias	10	1,48 ± 0,63	10	1,28 ± 0,76		
21 dias	14	0,93 ± 0,67	10	1,05 ± 0,56		

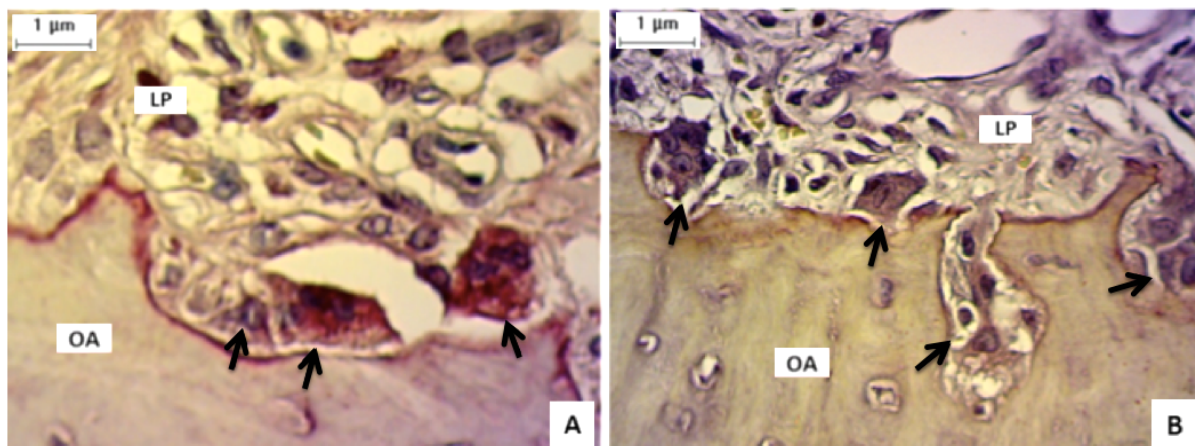
\*Nível de significância para o teste ANOVA a dois critérios: Valor  $P < 0,05$

### Neoformação de colágeno

Quando comparados os grupos sem MDI entre si, observou-se menor porcentagem de colágeno tipo I em I comparado a O no 21º dia ( $P < 0,05$ ). Na comparação entre os grupos com MDI entre si, observou-se menor porcentagem de colágeno tipo I em IM comparado a OM no 7º dia ( $P < 0,05$ ) (Tabela II).

### Reabsorção óssea

Não houve diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) na reabsorção óssea quando se avaliou a interação grupo x tempo (Tabela II; Fig 4).



**Fig 4.** Fotomicrografia do ligamento periodontal (LP) com áreas de reabsorção óssea e presença de osteoclastos, indicados pelas setas pretas, nos grupos OM (A) e IM (B), no 2º dia após instalação do dispositivo ortodôntico. OA, osso alveolar. (Coloração TRAP, magnificação 400x).

**Tabela II.** Médias e desvios padrão (DP) da porcentagem de colágeno tipo I e do número de osteoclastos por  $\mu\text{m}^2$  de ligamento periodontal (LP) nos grupos óleo vegetal (O), isotretinoína (I), óleo vegetal e movimento dentário induzido (OM) e isotretinoína e movimento dentário induzido (IM)

Grupo/ Variáveis	O (Média $\pm$ DP)	I (Média $\pm$ DP)	OM (Média $\pm$ DP)	IM (Média $\pm$ DP)	Comparações - Teste de Games-Howell		Potência observada
					OX I (p)*	OM X IM (p)*	
% colágeno tipo I							
2 dias	95,93 $\pm$ 3,29	91,33 $\pm$ 6,63	94,84 $\pm$ 4,59	89,29 $\pm$ 10,49	0,8420	0,9556	
7 dias	97,02 $\pm$ 2,61	93,38 $\pm$ 5,48	96,74 $\pm$ 1,13	90,35 $\pm$ 6,72	0,8382	0,0047*	0,9934
14 dias	94,77 $\pm$ 2,35	91,83 $\pm$ 6,75	96,25 $\pm$ 2,22	96,82 $\pm$ 2,52	0,9866	1,0000	
21 dias	97,74 $\pm$ 1,20	92,01 $\pm$ 4,84	96,39 $\pm$ 3,57	94,17 $\pm$ 5,93	0,0111*	0,9984	
Nº de Osteoclastos por $\mu\text{m}^2$ de LP							
2 dias	7,81 $\pm$ 1,96	8,18 $\pm$ 5,99	19,99 $\pm$ 3,77	19,60 $\pm$ 5,96	0,9999	0,9999	
7 dias	6,52 $\pm$ 2,69	5,22 $\pm$ 1,83	11,49 $\pm$ 5,63	13,60 $\pm$ 3,98	0,9919	0,9995	0,9988
14 dias	7,77 $\pm$ 2,35	8,36 $\pm$ 3,64	9,26 $\pm$ 4,94	9,89 $\pm$ 5,40	0,9999	0,9999	
21 dias	6,29 $\pm$ 2,43	5,73 $\pm$ 1,61	8,34 $\pm$ 4,44	7,47 $\pm$ 2,61	0,9999	0,9999	

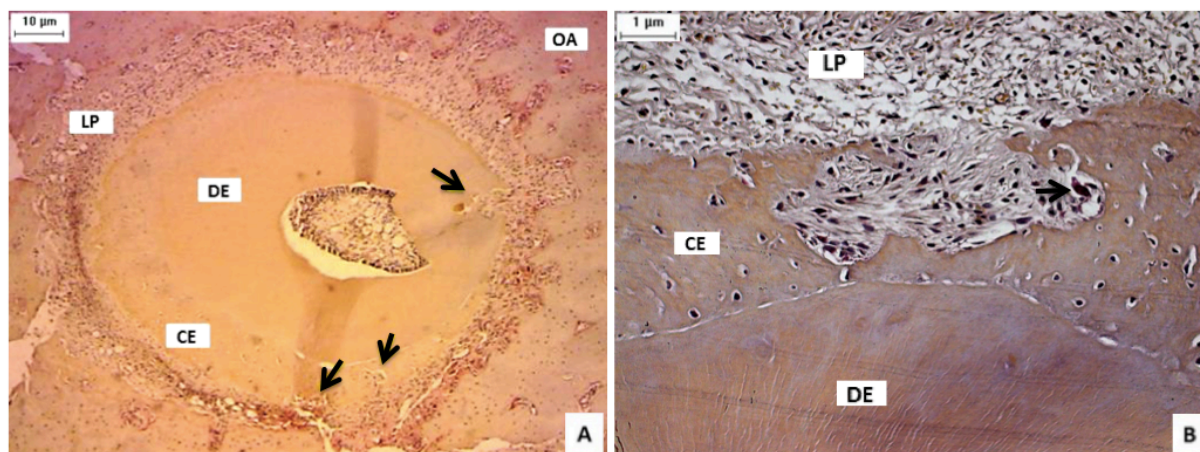
\* Nível de significância para o teste de Games-Howell:  $P < 0,05$

### Reabsorção radicular

Houve diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) na reabsorção radicular no 2º, 7º e 21º dias entre os grupos OM e IM quando comparada a interação grupo x tempo (Tabela III; Fig 5).



No 2º e no 21º dias a média do número de cementoclastos foi menor no grupo IM comparado ao grupo OM. No 7º dia o número de cementoclastos foi maior no grupo IM comparado ao grupo OM.



**Fig 5.** Fotomicrografia do ligamento periodontal (LP) com áreas de reabsorção radicular e presença de cementoclastos, indicados pelas setas pretas, no grupo OM no 21º dia após instalação do dispositivo ortodôntico. OA, osso alveolar; DE, dentina e CE, cimento. (Coloração TRAP, magnificação 40x (A) e 400x (B)).

**Tabela III.** Médias ( $10^{-6}$ ) e desvios padrão (DP  $10^{-6}$ ) do número de cementoclastos por  $\mu\text{m}^2$  de ligamento periodontal (LP) nos grupos óleo vegetal (O), isotretinoína (I), óleo vegetal e movimento dentário induzido (OM) e isotretinoína e movimento dentário induzido (IM)

Grupo/ Variáveis	O (Média $\pm$ DP)	I (Média $\pm$ DP)	OM (Média $\pm$ DP)	IM (Média $\pm$ DP)	Comparações - Método Pairwise de Dunn	
					OX I (p)*	OM X IM (p)*
Nº de Cementoclastos por $\mu\text{m}^2$ de LP						
2 dias	1,31 $\pm$ 1,11	1,55 $\pm$ 0,25	1,53 $\pm$ 1,68	0,00 $\pm$ 0,00	0,3849	0,0074*
7 dias	0,56 $\pm$ 1,04	0,89 $\pm$ 1,05	0,00 $\pm$ 0,00	1,86 $\pm$ 1,74	0,4206	0,0030*
14 dias	0,77 $\pm$ 0,88	0,00 $\pm$ 0,00	2,18 $\pm$ 2,75	2,06 $\pm$ 3,63	0,0969	0,3983
21 dias	1,68 $\pm$ 0,39	1,48 $\pm$ 0,27	4,16 $\pm$ 2,75	1,32 $\pm$ 1,61	0,6479	0,0048*

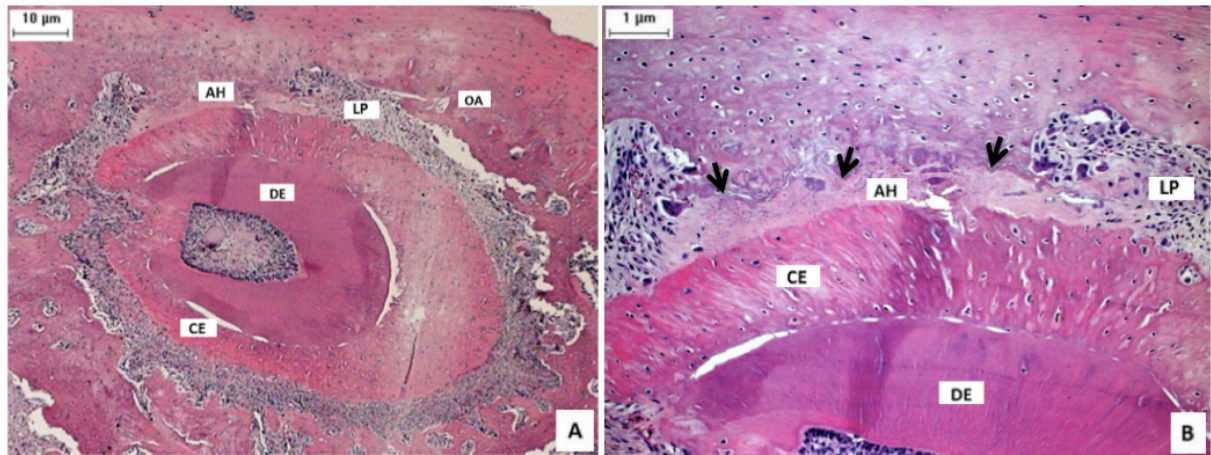
\* Nível de significância para o teste de Dunn:  $P < 0,05$

### Área hialina

Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparada a interação grupo x tempo ( $P > 0,05$ ), havendo presença de área hialina nos grupos OM nos 2º, 7º e 14º dias, e IM nos 2º, 14º, e 21º dias. A média do valor da porcentagem de área hialina por micrômetros quadrados do ligamento periodontal foi

de 2,62 em IM e de 2,92 em OM. Não foram observadas áreas hialinas nos grupos O e I.

Devido ao pequeno número de valores encontrados, utilizou-se a análise de frequências, sendo consideradas a presença ou ausência das áreas hialinas (Tabela IV; Fig 6).



**Fig 6.** Fotomicrografia do ligamento periodontal (LP) com presença de área hialina (AH), indicada pelas setas pretas, no grupo OM no 7º dia após instalação do dispositivo ortodôntico. OA, osso alveolar; DE, dentina e CE, cimento. (Coloração HE, magnificação 40x (A) e 400x (B)).

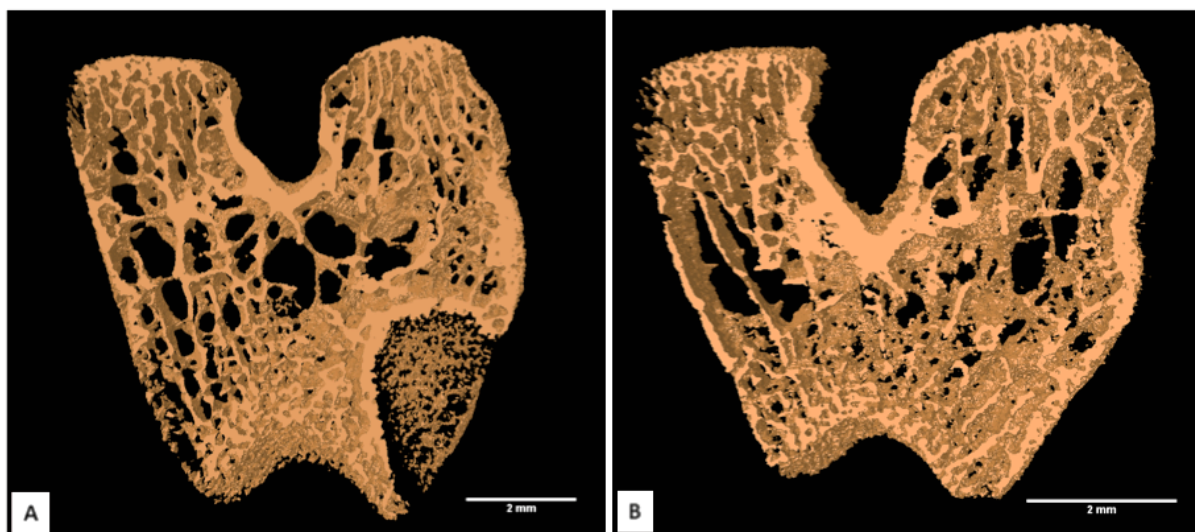
**Tabela IV.** Frequência da presença de área hialina (%) nos grupos óleo vegetal e movimento dentário induzido (OM) e isotretinoína e movimento dentário induzido (IM)

Grupo/ Variáveis	OM		IM	
	(n)	(%)	(n)	(%)
Área hialina				
2 dias	10	10,0 <sub>a</sub>	10	10,0 <sub>a</sub>
7 dias	10	20,0 <sub>a</sub>	10	0,0 <sub>a</sub>
14 dias	10	10,0 <sub>a</sub>	10	10,0 <sub>a</sub>
21 dias	14	0,0 <sub>a</sub>	10	10,0 <sub>a</sub>

\*Nível de significância para o Teste Qui-Quadrado: letras iguais indicam semelhança estatística na comparação dois a dois

### Micro-tomografia computadorizada

Não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) quando se avaliou volume trabecular, espessura trabecular, separação trabecular, e número trabecular na interação entre grupo x tempo (Tabela V; Fig 7).



**Fig 7.** Imagens representativas da reconstrução tridimensional do osso trabecular do fêmur dos ratos: (A) grupo óleo vegetal e movimento dentário induzido (OM), e (B) grupo isotretinoína e movimento dentário induzido (IM) no 7º dia.

**Tabela V.** Médias e desvios padrão (DP) das variáveis: volume trabecular (BV/TV %), espessura trabecular (Tb.Th mm), separação trabecular (Tb.Sp mm) e número trabecular (Tb.N 1/mm), nos grupos óleo vegetal (O), isotretinoína (I), óleo vegetal e movimento dentário induzido (OM) e isotretinoína e movimento dentário induzido (IM)

Grupo/ Variáveis	O (Média ± DP)	I (Média ± DP)	OM (Média ± DP)	IM (Média ± DP)	Comparações - Método Pairwise de Dunn	
					OX I (p)*	OM X IM (p)*
<b>BV/TV</b>						
7 dias	0,78 ± 0,11	0,69 ± 0,10	0,64 ± 0,20	0,71 ± 0,12	0,3415	0,7781
21 dias	0,81 ± 0,04	0,88 ± 0,07	0,73 ± 0,07	0,77 ± 0,12	0,4149	0,6208
<b>Tb.Th</b>						
7 dias	0,87 ± 0,21	0,66 ± 0,12	0,65 ± 0,19	0,84 ± 0,15	0,1710	0,2491
21 dias	0,80 ± 0,12	0,99 ± 0,22	0,68 ± 0,13	0,82 ± 0,20	0,3758	0,2920
<b>Tb.Sp</b>						
7 dias	0,24 ± 0,14	0,30 ± 0,12	0,39 ± 0,27	0,35 ± 0,18	0,4717	0,8879
21 dias	0,19 ± 0,06	0,12 ± 0,05	0,25 ± 0,06	0,25 ± 0,16	0,3867	0,6961
<b>Tb.N</b>						
7 dias	0,93 ± 0,18	1,05 ± 0,15	0,98 ± 0,13	0,85 ± 0,12	0,4063	0,2837
21 dias	1,03 ± 0,16	0,93 ± 0,16	1,09 ± 0,14	0,97 ± 0,22	0,4625	0,3002

\* Nível de significância para o teste de Dunn:  $P < 0,05$

## DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliados o deslocamento dentário, a remodelação óssea e os tecidos dentários após a realização do MDI em molares de ratos



submetidos ao uso da isotretinoína, e verificou-se que este fármaco exerceu pouca influência sobre as estruturas analisadas.

Os resultados do presente estudo mostraram que o medicamento utilizado não afetou o deslocamento dos dentes que foram submetidos ao MDI. O valor de  $P$  foi limítrofe quando se comparou os grupos OM e IM ao longo dos períodos de avaliação. Embora o tamanho da amostra utilizada possa interferir no valor de  $P$ , o resultado encontrado em relação ao deslocamento dentário é compatível com os valores encontrados no número de osteoclastos, uma vez que não foi encontrada diferença na reabsorção óssea no presente estudo. Nishio et al.<sup>23</sup> também não encontraram diferença no deslocamento dentário em ratos submetidos ao uso da isotretinoína; entretanto, os autores realizaram extração dentária, o que dificulta a comparação com o presente estudo. Por outro lado, Rohde et al.<sup>12</sup> relataram que a vitamina A tem efeito direto sobre os ossos, causando desmineralização ou reabsorção, dado também encontrado no estudo de Conaway et al.<sup>36</sup>

No presente estudo houve presença de reabsorção radicular nos grupos submetidos ao MDI. Não foram encontrados estudos que relacionassem o uso da isotretinoína e a reabsorção dentária radicular. No 2º dia observou-se ação restritiva da reabsorção radicular no grupo IM comparado ao grupo OM, sendo que a média do número de cementoclastos foi menor no grupo IM. No 7º dia entretanto, o grupo IM apresentou maior reabsorção radicular comparado ao grupo OM. Esse fato pode ter ocorrido pelo tempo de exposição ao medicamento ter sido maior do que no 2º dia, associado ao pico de células clásticas, que ocorre geralmente do 3º ao 5º dia após o início do MDI.<sup>13</sup> No final do período de observação, no 21º dia, o grupo IM voltou a apresentar diminuição na reabsorção radicular na comparação com o grupo OM, indicando que houve uma ação restritiva da isotretinoína no final do MDI, quando o processo de remodelação óssea já está finalizado.<sup>13</sup> Esse achado pode ser positivo para pacientes que utilizam isotretinoína e realizam o tratamento ortodôntico.

O colágeno tipo I, sintetizado e secretado pelos osteoblastos, compõe cerca de 95% da matriz orgânica do osso. Durante a reabsorção óssea, este colágeno é degradado, e no processo de reparo das fibras imaturas, o colágeno tipo III é depositado.<sup>29,30</sup> A neoformação do colágeno se inicia entre os 5 e 7 dias, com pico entre 5 e 10 dias, e se completa até 14 e 21 dias.<sup>13</sup> No presente estudo, foi possível verificar que a isotretinoína diminuiu a quantidade das fibras colágenas tipo I

presentes na matriz óssea neoformada aos 7 dias, ao comparar os grupos IM e OM. Entretanto, quando avaliou-se aos 14 e 21 dias, os grupos se equivalem, indicando a recuperação do processo de maturação do colágeno, não interferindo, portanto, na fase final do MDI. Os dados do presente estudo diferem do estudo de Nishio et al<sup>23</sup> em que foi avaliado o MDI em ratos tratados com isotretinoína após realizar extração dentária, e os resultados mostraram que houve aceleração no reparo gengival após 7 dias. Bergoli et al<sup>24</sup> também concluíram que houve aceleração no reparo ósseo após a realização de extração dentária em ratos.

No presente estudo, a isotretinoína retardou a fase inicial da neoformação óssea, que se normalizou ao longo do processo. Esse resultado corrobora com o estudo de Frankel et al<sup>9</sup> no qual concluíram que a vitamina A atua diretamente sobre a cartilagem embriogênica e osso, o que causa interferência na formação de colágeno, evitando a diferenciação normal de osteoblastos e aumentando o número de osteoclastos, retardando dessa forma o processo de neoformação óssea. Tanaka et al<sup>17</sup> também mostraram que a vitamina A influencia na diferenciação dos osteoblastos e na formação óssea.

Os resultados do presente estudo mostraram que a administração de isotretinoína 7,5mg/kg associada ou não ao MDI não influenciou no processo de reabsorção óssea, uma vez que a quantidade de osteoclastos não sofreu nenhuma alteração significativa. Em contrapartida, Lind et al<sup>6</sup> constataram que grandes quantidades da vitamina A administrada em ratos levaram à reabsorção mineral acelerada do osso cortical e trabecular como resultado do aumento da atividade osteoclástica. De modo semelhante, Scheven e Hamilton<sup>18</sup> concluíram que a isotretinoína antagoniza a capacidade da vitamina D em manter normais os níveis séricos de cálcio, o que estimula a formação de osteoclastos e suprime a atividade osteoblástica, podendo contribuir para acelerar a reabsorção óssea nos casos de doses excessivas de isotretinoína. A dose empregada no presente estudo e o tempo de aplicação do medicamento podem ter influenciado na inalteração do número de osteoclastos, uma vez que a dose empregada não foi excessiva.<sup>21,24,25</sup> Por outro lado, os resultados do presente estudo corroboram com os estudos de Tekin et al<sup>19</sup> e DiGiovanna et al,<sup>20</sup> uma vez que não foi encontrada diferença significativa na densidade mineral óssea em pacientes tratados com um único ciclo, de 4 a 6 meses, de isotretinoína, e com dosagens padrão de aproximadamente 1mg/Kg/dia.

No presente trabalho foi administrada a dose de 7,5mg/kg, utilizada por um período variável de 32 a 51 dias, de acordo com o período de observação. Esta dose em ratos, produz níveis séricos da medicação comparáveis àqueles em humanos que utilizam como terapia padrão a isotretinoína a 1mg/kg/dia.<sup>21,24,25</sup> Como tratamento padrão de afecções cutâneas em humanos, a isotretinoína é usada em dose que varia de 0,5 a 2mg/Kg de peso por dia, durante um período de 5 meses, totalizando, ao final do tratamento, aproximadamente 120mg/Kg de peso.<sup>16,19,20</sup> Os efeitos colaterais da isotretinoína são dependentes da dose e da duração do tratamento, estando diretamente relacionados ao uso de doses elevadas por períodos de tempo prolongados.<sup>7,21,22</sup>

Observou-se no presente estudo, presença de áreas hialinas nos grupos submetidos ao MDI, independente da solução administrada, no entanto não houve diferença entre os mesmos. O 7º dia foi o que apresentou maior área hialina, embora a força aplicada de 30cN seja considerada leve, ideal para produzir MDI em ratos sem causar efeitos indesejáveis.<sup>26</sup> As diferentes forças aplicadas para a realização do MDI em ratos dificultam a comparação dos resultados entre os estudos, Nishio et al<sup>23</sup>, Gameiro et al<sup>37</sup> e Hauber et al<sup>38</sup> utilizaram 50 cN. No trabalho de Hamaya et al,<sup>14</sup> em que avaliou-se o MDI sem administração de fármacos e utilizou-se 10 g de força, após o 7º dia as áreas hialinas diminuíram. Geralmente, quando há presença de áreas hialinas, sua manifestação ocorre de 1 a 2 dias após o início do MDI e desde que a força aplicada não seja reativada, essas áreas tendem a sofrer reparação tecidual após o 7º dia.<sup>14</sup> No presente estudo, apesar do 7º dia ter apresentado maior quantidade de área hialina, sua frequência observada, considerando os grupos e tempos avaliados, foi baixa.

Para avaliar as possíveis mudanças ocasionadas pela isotretinoína na microarquitetura do osso trabecular, foi realizada micro-tomografia nos fêmures dos ratos estudados. O fêmur foi analisado para avaliar uma possível ação sistêmica do fármaco nos ossos, como no estudo de Frigotto et al.<sup>27</sup> O uso da isotretinoína não demonstrou efeitos relevantes sobre o osso trabecular no presente estudo. O aumento na separação das trabéculas (Tb.Sp) é indicativo de diminuição da qualidade óssea, e sugere possível desequilíbrio no *turnover* ósseo,<sup>32,33</sup> entretanto os resultados do presente estudo não apresentaram diferenças nos aspectos avaliados. O presente resultado difere do estudo de Johansson e Melhus,<sup>11</sup> que realizaram micro-tomografia computadorizada e concluíram que a isotretinoína além

de causar diretamente reabsorção óssea, pode levar indiretamente à diminuição da densidade óssea pela interferência da ação da vitamina D.

Os retinóides atuam como importantes agentes moduladores no osso.<sup>6,17</sup> Nishio et al<sup>23</sup> não encontraram alterações significativas na micro-tomografia do trabeculado ósseo após a utilização de isotretinoína em ratos, resultado também encontrado no presente estudo. Por outro lado, o estudo de Lind et al<sup>6</sup> mostrou, por meio de micro-tomografia computadorizada, significativa redução na densidade óssea na calvária de ratos. Tanaka et al<sup>17</sup> avaliaram fêmures de ratos por meio de micro-tomografia computadorizada e concluíram que a vitamina A atua na osteoblastogênese e na formação óssea.

Os possíveis efeitos colaterais associados com o crescente número de adolescentes e adultos jovens que fazem uso da isotretinoína, levam alguns estudos a questionarem o real papel da vitamina A e sua administração excessiva em humanos.<sup>16,39</sup> Vale ressaltar que é durante a adolescência e a fase de adulto jovem que o osso mineral é ativamente adquirido e o seu armazenamento maximizado, sendo também esta, a média de idade dos pacientes que mais frequentemente fazem uso da isotretinoína no tratamento de acne severa<sup>5</sup> e também que são submetidos ao tratamento ortodôntico.<sup>23</sup>

No presente estudo, os efeitos da isotretinoína no MDI não mostraram alterações significativas no deslocamento dentário, na remodelação óssea e na microarquitetura do osso trabecular em ratos. As divergências entre dose utilizada do medicamento, tempo de aplicação do medicamento e força empregada para a realização do MDI dificultam a comparação dos resultados do presente estudo com os demais estudos encontrados. São necessárias maiores investigações com aplicação de doses maiores, tempo prolongado e maior força empregada no MDI para verificar os efeitos colaterais da isotretinoína sobre o osso, uma vez que não existe um consenso na literatura. Dentro do modelo animal utilizado no presente estudo, observou-se que a medicação, nas condições empregadas, pode ser utilizada durante o tratamento ortodôntico com segurança.

## **CONCLUSÕES**

O uso de isotretinoína 7,5mg/kg durante o movimento dentário induzido em ratos não interferiu no deslocamento dentário, no processo de neoformação e

reabsorção óssea, na presença de áreas hialinas e na microarquitetura óssea, e diminuiu a presença de reabsorção radicular.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos a Pontifícia Universidade Católica do Paraná pelo apoio financeiro parcial desta pesquisa.

## **REFERÊNCIAS**

1. Seité S, Caixeta C, Towersey L. Large-scale survey to describe acne management in Brazilian clinical practice. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2015;8:571-7.
2. Silverberg JI, Silverberg NB. Epidemiology and extracutaneous comorbidities of severe acne in adolescence: a U.S. population-based study. *Br J Dermatol*. 2014;170(5):1136-42.
3. Leyden JJ, Del Rosso JQ, Baum EW. The use of isotretinoin in the treatment of acne vulgaris: clinical considerations and future directions. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2014;7(2 Suppl):S3-S21.
4. Fleischer AB Jr, Simpson JK, McMichael A, Feldman SR. Are there racial and sex differences in the use of oral isotretinoin for acne management in the United States? *J Am Acad Dermatol*. 2003;49(4):662-6.
5. Kochhar DM, Christian MS. Tretinoin: a review of the nonclinical developmental toxicology experience. *J Am Acad Dermatol*. 1997;36(3 Pt 2):S47-59.
6. Lind T, Ohman C, Calounova G, Rasmusson A, Andersson G, Pejler G, Melhus H. Excessive dietary intake of vitamin A reduce skull bone thickness in mice. *PloS One*. 2017;12(4):e0176217.
7. Kindmark A, Rollman O, Mallmin H, Petré-Mallmin M, Ljunghall S, Melhus H. Oral isotretinoin therapy in severe acne induces transient suppression of biochemical markers of bone turnover and calcium homeostasis. *Acta Derm Venereol*. 1998;78(4):266-9.
8. Silverman AK, Ellis CN, Voorhees JJ. Hypervitaminosis A syndrome: a paradigm of retinoid side effects. *J Am Acad Dermatol*. 1987;16(5 Pt 1):1027-39.
9. Frankel TL, Seshadri MS, McDowall DB, Cornish CJ. Hypervitaminosis A and calcium-regulating hormones in the rat. *J Nutr*. 1986;116(4):578-87.

10. Rohde CM, DeLuca H. All-trans retinoic acid antagonizes the action of calciferol and its active metabolite, 1,25-dihydroxycholecalciferol, in rats. *J Nutr.* 2005;135(7):1647-52.
11. Johansson S, Melhus H. Vitamin A antagonizes calcium response to vitamin D in man. *J Bone Miner Res.* 2001;16(10):1899-905.
12. Rohde CM, Manatt M, Clagett-Dame M, DeLuca HF. Vitamin A antagonizes the action of vitamin D in rats. *J Nutr.* 1999;129(12):2246-50.
13. Reitan K. Tissue behavior during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod.* 1960;46(12):881-900.
14. Hamaya M, Mizoguchi I, Sakakura Y, Yajima T, Abiko Y. Cell death of osteocytes occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. *Calcif Tissue Int.* 2002;70(2):117-26.
15. Heller IJ, Nanda R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod.* 1979;75(3):239-58.
16. Leachman SA, Insogna KL, Katz L, Ellison A, Milstone LM. Bone densities in patients receiving isotretinoin for cystic acne. *Arch Dermatol.* 1999;135(8):961-5.
17. Tanaka K, Tanaka S, Sakai A, Ninomiya T, Arai Y, Nakamura T. Deficiency of vitamin A delays bone healing process in association with reduced BMP2 expression after drill-hole injury in mice. *Bone.* 2010;47(6):1006-12.
18. Scheven BA, Hamilton NJ. Retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulate osteoclast formation by different mechanisms. *Bone.* 1990;11(1):53-9.
19. Tekin NS, Ozdolap S, Sarikava S, Keskin SI. Bone mineral density and bone turnover markers in patients receiving a single course of isotretinoin for nodulocystic acne. *Int J Dermatol.* 2008;47(6):622-5.
20. DiGiovanna JJ, Landman CB, Tschen EH, Jones T, Menter A, Lowe NJ et al. Effect of a single course of isotretinoin therapy on bone mineral density in adolescent patients with severe, recalcitrant, nodular acne. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51(5):709-17.
21. Ferguson SA, Cisneros FJ, Gough B, Hanig JP, Berry KJ. Chronic oral treatment with 13-cis-retinoic acid (isotretinoin) or all-trans-retinoic acid does not alter depression-like behaviors in rats. *Toxicol Sci.* 2005;87(2):451-9.
22. DiGiovanna JJ. Isotretinoin effects on bone. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45(5):S176-82.

23. Nishio C, Rompré P, Moldovan F. Effect of exogenous retinoic acid on tooth movement and periodontium healing following tooth extraction in a rat model. *Orthod Craniofac Res*. 2017;20 Suppl 1:77-82.
24. Bergoli RD, Chagas Junior OL, Souza CE, Vogt BF, Oliveira HT, Etges A, Silva DN. Isotretinoin effect on alveolar repair after exodontia – a study in rats. *Oral Maxillofac Surg*. 2011;15(2):85-92.
25. Oliveira HT, Bergoli RD, Hirsch WD, Chagas OL Jr, Heitz C, Silva DN. Isotretinoin effect on the repair of bone defects – a study in rat calvaria. *J Craniomaxillofac Surg*. 2013;41(7):581-5.
26. Ribeiro JS, Maciel JV, Knop LA, Machado MA, Gregio AM, Camargo ES. Effect of growth hormone in experimental tooth movement. *Braz Dent J* 2013;24(5):503-7.
27. Frigotto GCF, Araujo CM, Guariza Filho O, Tanaka OM, Johann ACBR, Camargo ES. Effect of fluoxetine on induced tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2015;148(3):450-6.
28. Retamoso L, Knop L, Shintcovsk R, Maciel JV, Machado MA, Tanaka O. Influence of anti-inflammatory administration in collagen maturation process during orthodontic tooth movement. *Microsc Res Tech* 2011;74(8):709-13.
29. Borges LF, Gutierrez PS, Marana HR, Taboga SR. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. *Micron* 2007;38(6):580-83.
30. Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int*. 1996;20(1):15-27.
31. Fracalossi ACC, Santamaria Jr M, Consolaro MFMO, Consolaro A. Experimental tooth movement in murines: study period and direction of microscopic sections. *Dent Press J Orthod* 2009;14(1):143-57.
32. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987;2(6):595-610.
33. Hildebrand T, Laib A, Muller R, Dequeker J, Ruegsegger P. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *J Bone Miner Res* 1999;14(7):1167-74.
34. Midtgard J, Bjork G, Linder-Aronson S. Reproducibility of cephalometric landmarks and errors of measurements of cephalometric cranial distances. *Angle*

Orthod 1974;44(1):56-61.

35. Houston WJ. The analysis of errors in orthodontic measurements. *Am J Orthod* 1983;83(5):382-90.

36. Conaway HH, Henning P, Lerner UH. Vitamin A metabolism, action, and role in skeletal homeostasis. *Endocr Rev*. 2013;34(6):766-97.

37. Gameiro GH, Nouer DF, Pereira-Neto JS, de Araújo Magnani MB, de Andrade ED, Novaes PD, de Arruda Veiga MC. Histological analysis of orthodontic root resorption in rats treated with the cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor celecoxib. *Orthod Craniofac Res*. 2008;11(3):156-61.

38. Hauber Gameiro G, Nouer DF, Borges De Araújo Magnani MB, Duarte Novaes P, Bovi Ambrosano GM, Da Silva Andrade A, Ferraz De Arruda Veiga MC. *Minerva Stomatol*. 2008;57(11-12):569-75.

39. Penniston KL, Tanumihardjo SA. Vitamin A in dietary supplements and fortified foods: too much of a good thing? *J Am Diet Assoc*. 2003;103(9):1185-7.



**ARTIGO EM INGLÊS**

## TITLE PAGE

# EFFECT OF ISOTRETINOIN ON INDUCED TOOTH MOVEMENT IN RATS

**Ariane Ximenes Graciano Parra**, MsC

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

School of Life Sciences

Post-Graduate Dentistry Program, Orthodontics

E-mail: [arianeximenes@hotmail.com](mailto:arianeximenes@hotmail.com)

**Ana Maria Trindade Grégio**, PhD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

School of Life Sciences

Post-Graduate Dentistry Program, Stomatology and Biosciences

E-mail: [ana.gregio@pucpr.br](mailto:ana.gregio@pucpr.br)

**Elisa Souza Camargo**, PhD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

School of Life Sciences

Post-Graduate Dentistry Program, Orthodontics

E-mail: [escamargo@uol.com.br](mailto:escamargo@uol.com.br)

## Contact address

**Aline Cristina Batista Rodrigues Johann**, PhD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

School of Life Sciences

Post-Graduate Dentistry Program, Stomatology and Biosciences

Rua: Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho 80215-901, Curitiba, Paraná, Brazil

Phone: +55-41-3271-1637

E-mail: [aline.johann@pucpr.br](mailto:aline.johann@pucpr.br)

## ABSTRACT

**Introduction:** To evaluate the effect of isotretinoin on tooth displacement and on tissues related to induced tooth movement (ITM) in rats. **Methods:** Wistar rats were randomly divided into four groups: O (n = 40), vegetable oil; I (n = 40), 7.5 mg/kg isotretinoin; OM (n = 44), vegetable oil and ITM; and IM (n = 39), 7.5 mg/kg isotretinoin and ITM. After the 30th day of application of the solutions, an orthodontic appliance was installed that moved the first right upper molar mesially (30 cN) in OM and IM groups. The animals were euthanized 2, 7, 14 or 21 days after placement of the devices. The animals in groups O and I did not undergo ITM, but were euthanized at the same time points. The animals were examined for tooth displacement, neoformation of type I collagen by picosirius staining, bone and root resorption by tartrate-resistant acid phosphatase staining, presence of hyaline areas by hematoxylin and eosin staining, and trabecular bone modeling by microcomputed tomography. The data were analyzed by ANOVA, Games-Howell, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, and Dunn test, at a significance level of 5%. **Results:** There was no difference in tooth displacement in the OM and IM groups across the periods tested ( $P > 0.05$ ). There was no difference in the number of osteoclasts, presence of hyaline areas, trabecular volume, trabecular thickness, trabecular separation, and trabecular number among groups O, I, OM, and IM across the periods tested ( $P > 0.05$ ). A lower percentage of type I collagen was observed in the IM group than in the OM group at day 7 ( $P < 0.05$ ). A lower frequency of areas of root resorption was observed in the IM group on the second and 21st days than in the OM group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** Isotretinoin at 7.5 mg/kg did not interfere tooth movement, collagen neoformation, bone resorption, hyaline areas, or bone microarchitecture. It did, however, decrease root resorption in rats subjected to ITM.

**Keywords:** Isotretinoin; Tooth movement techniques; Bone remodeling

## INTRODUCTION

Acne is the most common skin disease among adolescents, with a prevalence of 80–90%.<sup>1</sup> A study on American individuals showed that 12.1% of 17-year-olds have severe acne.<sup>2</sup> Isotretinoin, or 13-cis-retinoic acid, is the drug of choice for the treatment of this disease, and its use is significant among adolescents and young adults.<sup>1,3-5</sup>

Isotretinoin is derived from vitamin A, and was first marketed in 1982.<sup>3</sup> A high intake of isotretinoin can cause many side effects, similar to those of hypervitaminosis A.<sup>6-9</sup> Studies have shown that vitamin A antagonizes the actions of vitamin D,<sup>7,9-12</sup> because both require the same binding proteins, the X-retinoic receptors, to perform their transcription activity.<sup>12</sup> Consequently, high doses of vitamin A may cause side effects on bone.<sup>7,9-12</sup>

Induced tooth movement (ITM) is caused by biomechanical forces on the teeth. This action generates a complex biological process, characterized by sequential reactions in two regions of the periodontal tissue, the area of compression and the area of tension.<sup>13</sup> Tissue remodeling is induced by activation of alveolar bone resorption in the compression area and the resulting bone apposition in the tension area.<sup>14,15</sup> Several drugs, on entering the systemic circulation, can alter the biological reactions related to ITM.

Several side effects of isotretinoin on bone tissue have been reported, including reduction of bone mineral density,<sup>6,11,16</sup> calcification of tendons and ligaments,<sup>9</sup> increased bone resorption, increased number and size of osteoclasts, and changes in the differentiation of osteoblasts.<sup>17,18</sup> Two studies found no differences in bone mineral density in patients treated with isotretinoin at 1 mg/kg/day,<sup>19,20</sup> thus the treatment time and dose of isotretinoin used seem to influence its effects on bone tissue.<sup>7,21,22</sup>

Other authors found acceleration of the alveolar bone repair process after tooth extraction in rats.<sup>23,24</sup> Although the use of isotretinoin for ITM has been studied,<sup>23</sup> until the present study, its effects on root resorption and hyaline areas have not been evaluated. Some evidence shows that the presence of isotretinoin may alter bone metabolism; however, definitive studies of its effects in ITM are lacking. Thus, the present study evaluated tooth displacement, collagen neoformation, bone and root resorption, the presence of hyaline areas, and bone

microarchitecture in rats exposed to ITM and isotretinoin. No studies were found in the literature that evaluated the aspects considered in the present study.

In view of the changes that isotretinoin can cause in bone tissue, and considering the widespread use of this drug among adolescents and young adults, who represent most of the patients who undergo orthodontic treatment, it is necessary to investigate the possibility of isotretinoin action on induced tooth movement.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Subjects**

This research was approved by the Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR) Ethics Committee on Animal Use (CEUA), and registered under opinion No. 935 (Supplementary materials I, page 47).

A total of 163 male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) weighing approximately 200 g, 6 to 8 weeks old, were collected and maintained in the PUCPR vivarium.

The animals were maintained at a controlled temperature between 19°C and 22°C, with a photoperiod of 12 hours light and 12 hours dark. Water and rat chow were supplied ad libitum. To determine the correct drug dosages, the animals were weighed at the beginning of the experiment, and then weekly until the day of euthanasia, using a precision electronic scale (Gehaka - BG 4001, São Paulo, Brazil).

The animals were randomly divided into four groups: O (n = 40), vegetable oil; I (n = 40), isotretinoin; OM (n = 44), vegetable oil and ITM; and IM (n = 39), isotretinoin and ITM. In groups O and OM, the animals received 0.5 ml of vegetable oil by gavage, once a day. In groups I and IM, applications of 7.5 mg/kg of isotretinoin were performed once daily.

Vegetable oil and isotretinoin were obtained from the Pharmaceutical Laboratory of PUCPR, Curitiba, Brazil. Isotretinoin was obtained in the form of a pharmaceutical powder, upon presentation of a special prescription for the drug. Isotretinoin powder was stored in a dark refrigerated package, and each suspension was prepared immediately prior to administration, because of the high sensitivity of the medication to light and heat.

At the time of administration of isotretinoin, for groups I and IM, the powder containing the drug was diluted in vegetable oil according to the weight of the animal, using a 10 ml syringe, until the dosage reached 7.5 mg/kg. The vial containing this solution was stirred, and the solution was immediately administered by gavage. The dosage and route of administration of isotretinoin were chosen according to the studies of Ferguson et al,<sup>21</sup> Bergoli et al,<sup>24</sup> and Oliveira et al.<sup>25</sup>

## **Experiment**

The solutions were administered to all groups for 30 days, in accordance with the study by Ribeiro et al.<sup>26</sup> On the 30th day, the animals in the OM and IM groups were sedated with Tiletamine and Zolazepan (Zoletil, Virbac Brasil Indústria e Comércio LTDA, Jurubatuba, Brazil) at a dosage of 50 mg/kg intraperitoneally. An orthodontic device was installed to induce ITM, matching the model used by Ribeiro et al,<sup>26</sup> which consisted of a closed nickel-titanium spring (G & H Wire, Franklin, IN), fixed to the first right maxillary molar (Morelli, São Paulo, Brazil), positioned in the most cervical region of the tooth, and connected to the maxillary central incisors (also in the most cervical region), causing mesial movement of the first molar (Figs. 1 and 2, Supplementary materials II, page 48). The reciprocal force produced by the closed spring was 30 cN, standardized using a tensiometer (Haag-Streit AG, Koeniz, Switzerland). To ensure greater spring stability, the mandibular incisors were abraded, and the maxillary incisors joined with the composite resin Charisma (Heraeus, Hanau, Germany). After the installation, the spring was not reactivated; however, its positioning was checked daily.

Administration of the solutions continued until the animals were euthanized by anesthetic overdose (Ketamine at 270 mg/kg and Xylazine at 30 mg/kg, intraperitoneally) on day 32, 37, 44, or 51, corresponding to the second, seventh, 14<sup>th</sup>, and 21<sup>st</sup> day after ITM, that is, after the placement of the devices. The animals in groups O and I, which did not undergo ITM, were euthanized at the same time points.

## **Dental displacement**

Tooth displacement was measured in millimeters in the animals of the OM and IM groups, with a digital caliper (Absolute; Mitutoyo, Kawasaki-Shi, Japan), positioned between the most cervical and central point on the palatal face of the

central incisor and the most cervical point in the middle of the mesial surface of the first molar, both in the right maxillary quadrant.

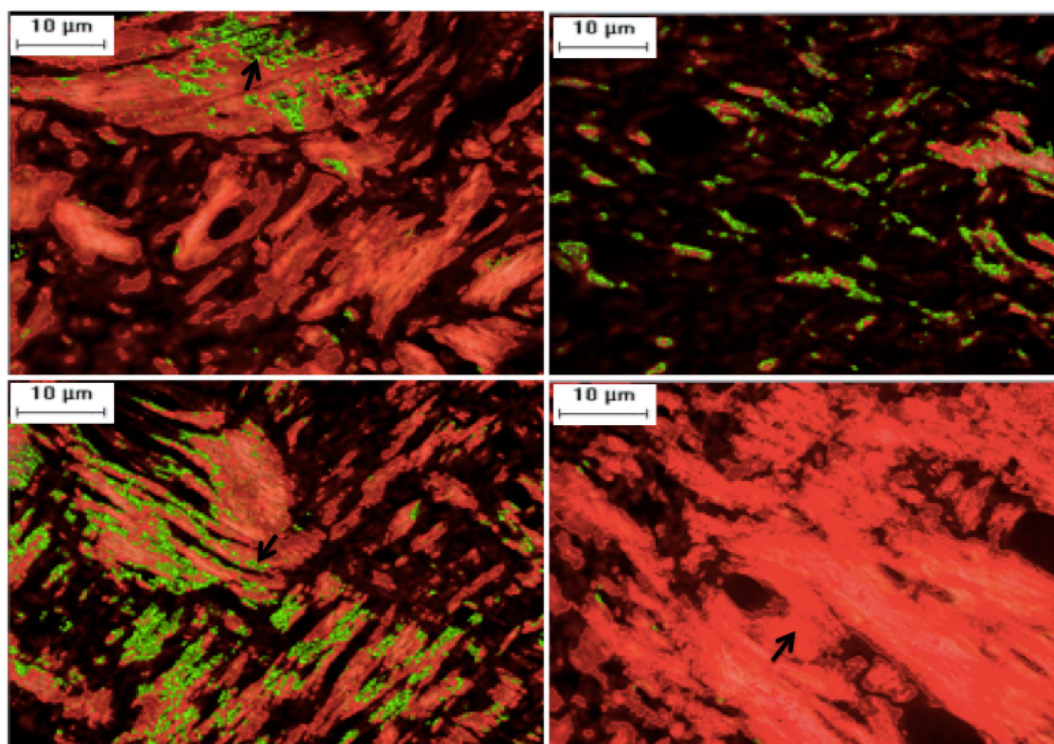
### **Laboratory processing**

The right hemimaxilla of each animal was removed, dissected, fixed in 10% formaldehyde for 24 hours, and decalcified in 5% ethylenediaminetetraacetic acid for three months. The specimens were processed and embedded in paraffin in the Laboratory of Experimental Pathology of PUCPR. Fifteen cross sections were obtained from the cervical third, in the apical direction of the mesiobuccal root of the first maxillary molar, cut using a microtome into sections with 4  $\mu\text{m}$  thickness, with a 60- $\mu\text{m}$  interval between sections. The sections were stained using the following histochemical techniques: Picrosirius (5 sections), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP; 5 sections), and hematoxylin and eosin (HE; 5 sections).

To examine the microarchitecture of trabecular bone, the left femurs of the animals were removed, dissected, and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ ; they were then evaluated by computerized microtomography, as described in the study by Frigotto et al.<sup>27</sup>

### **Histological analysis**

The neoformation of collagen was determined by polarization microscopy, using the Picrosirius histochemical method. The analysis was performed by a single examiner. The bone adjacent to the periodontal ligament (LP) in the distal portion of the mesiobuccal root was selected for analysis, because during ITM, bone tissue is deposited in the alveolar cortex in the traction area.<sup>28</sup> Another reason for selecting this area was that it allowed observation of the stretching of the fibers of the LP. An image was taken of each cross-section with an Olympus BX-50 light microscope (Olympus, Tokyo, Japan) and Olympus U-Pot polarized lens (Olympus, Tokyo, Japan) coupled to a Dino-Lite® AM4023X digital eyepiece (AmMo Electronics Corporation, New Taipei city 241, Taiwan), with a magnification of 200 $\times$ . With the aid of the Image Pro-Plus 4.5.029 morphometry program (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD), the percentage of mature and immature collagen was quantified on the basis of color differences. For this purpose, mask-filtered images (Fig 3) were used to evaluate type III (immature) collagen, with a greenish color and thinner, more disorganized fibers, and type I (mature) collagen, with a reddish color and thicker, more organized fibers.<sup>29,30</sup>



**Fig 3.** Application of the mask-filtered for the quantification of collagen type III (greenish) and type I (reddish), indicated by the black arrows (Picosírius, magnification 200x).

Histochemical TRAP staining was performed with the TRAP 387A kit (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO), following the manufacturer's instructions, to identify osteoclasts as well as cementoclasts, thus determining resorption of bone and cementum, respectively. For each of the 5 sections, images of the entire LP of the mesiobuccal root of the first molar were captured using the same light microscope and microcamera, with magnifications 40× and 400×. The image acquisition parameters were fixed during the capture process. In the images with magnification 400×, the number of osteoclasts was counted with the aid of the program Image Pro-Plus 4.5.029, in which a grid for counting was created. The counting was performed by a single examiner in two periods, with a minimum interval of three weeks between them. The reliability of the examiner was assessed using an intra-examiner test. Multinucleated TRAP-positive cells located in the LP adjacent to the alveolar bone were considered osteoclasts.<sup>31</sup> In the 40× magnification images, the LP area was measured using the "Create polygon feature" tool. To obtain the number of osteoclasts per square micron of the LP, the number of osteoclasts was divided by the area of the LP. In the images with magnification 400×, areas of root resorption



were noted. Multinucleated TRAP-positive cells in contact with or close to the root surfaces were considered to be cementoclasts.<sup>31</sup>

The presence of hyaline areas was evaluated with the HE staining method, throughout the LP of the mesiobuccal root of the first maxillary molar, using the same light microscope and microcamera, at a magnification of 40×. Hyaline areas were defined as areas of degeneration in the LP that were homogeneous and free of cells.<sup>31</sup> Hyaline areas were measured using the Image Pro-Plus 4.5.029 program, using the "Create polygon feature" tool, and then quantified as the percentage of hyaline area per square micron of LP.

The mean percentage of type I collagen, the number of osteoclasts per square micron of the LP, and the number of cementoclasts per square micron of the LP were obtained by averaging over the five sections used for each analysis.

### **Microtomographic analysis**

The distal epiphysis of the femur was analyzed using the method described by Frigotto et al.<sup>27</sup> A computerized microtomograph (Bruker SkyScan 1172, Bruker, Belgium, 2010) was used, with a voltage of 100 kV, a current of 100  $\mu$ A, and a filter of 0.5 mm thick aluminum. The samples were placed in a cylindrical sample holder, which maintained correct axial alignment and stability of the samples during image capture. Twelve slices, with a resolution of 12.8  $\mu$ m/pixel, were obtained in the central area of the distal epiphysis of each femur, by 180° rotation in 0.4° increments. The raw data were then reconstructed using the software NRecon 1.6.9.3 (Bruker SkyScan 1172, Bruker, Belgium). A volume of interest was selected for analysis and digitized. Cortical bone was excluded. A three-dimensional analysis was performed using CT Analyzer 1.14.4.1 software (Bruker SkyScan 1172, Bruker, Belgium), in which morphometric indices were calculated, including: trabecular volume (BV/TV), which corresponds to the volume occupied by trabecular, mineralized bone (BV), expressed as a percentage of the volume occupied by the bone marrow and trabeculae (TV); trabecular thickness (Tb.Th), which measures the thickness of bone trabeculae; (Tb.Sp), which corresponds to the distance between the midpoints of the trabeculae; and the trabecular number (Tb.N), which corresponds to the number of trabeculae per millimeter of tissue.<sup>32,33</sup> Due to the high cost of performing the microtomography in all study samples, the seventh and 21st observation days,

corresponding to the most significant tissue and bone changes during ITM and the final ITM phase, respectively, were selected.<sup>13,15</sup>

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using SPSS 23.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, Ill) and Statistica 7 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK).

The normality and homogeneity of variance between treatments (group × time) were determined using the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests, and the Levene test, respectively, at a significance level of 5%.

For continuous variables, when the tests were consistent with normal distribution and heterogeneity of variance of the variables across groups and times, we used analysis of variance (ANOVA), followed by the Games-Howell multiple comparison test for heterogeneous variances.

For continuous variables, when the tests did not show a normal distribution, the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used, followed by Dunn's multiple nonparametric comparison test. For variables with dichotomous categorical scales, analyses of independence according to group, time, and group and time interaction were performed using the chi-square test. When there was dependence between the variables ( $P < 0.05$ ), the Z-test for difference between two proportions was applied.

The observed power was used to calculate the power of the tests based on the sample size for the hypothesis of a difference between the mean values of the dependent variables as a function of group and time.

## **RESULTS**

In the intra-examiner test, the reproducibility of osteoclast and cementoclast counts was evaluated. Dahlberg's maximum error was 0.6947%, less than 1%, and the reliability coefficient was greater than 99%, indicating that the examiner reproduced the measurements reliably.<sup>34,35</sup> Student's t-test showed no systematic difference in the scores at a significance level of 5%.

### **Dental displacement**

There were no statistically significant differences ( $P > 0.05$ ) in tooth displacement, according to the group  $\times$  time interaction evaluated in the ANOVA comparing the OM and IM groups (Table I).

**Table I.** Mean and standard deviation (SD) of the tooth displacement (mm) in the groups vegetable oil and induced tooth movement (OM) and isotretinoin and induced tooth movement (IM)

Group/ Time point	OM (n)	OM (Mean $\pm$ SD)	IM (n)	IM (Mean $\pm$ SD)	$P^*$ value	Power test
2 days	10	0.84 $\pm$ 0.56	10	1.11 $\pm$ 0.67	0.0586	0.7572
7 days	10	1.58 $\pm$ 0.58	10	0.90 $\pm$ 0.44		
14 days	10	1.48 $\pm$ 0.63	10	1.28 $\pm$ 0.76		
21 days	14	0.93 $\pm$ 0.67	10	1.05 $\pm$ 0.56		

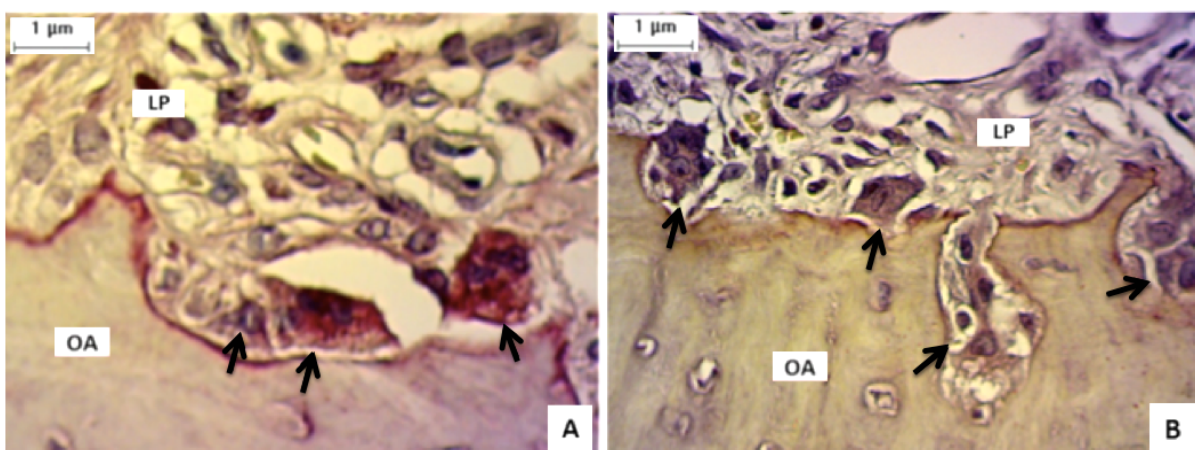
\*Analysis of variance (ANOVA) significance level:  $P < 0.05$

### Collagen neoformation

When comparing the groups without ITM, a lower percentage of type I collagen was observed in I compared to O at day 21 ( $P < 0.05$ ). In the comparison between the groups with ITM, a lower percentage of type I collagen was observed in MI compared to OM at day 7 ( $P < 0.05$ ) (Table II).

### Bone resorption

There were no statistically significant differences ( $P > 0.05$ ) in bone resorption when the group  $\times$  time interaction was assessed (Table II, Fig 4).



**Fig 4.** Photomicrography of the periodontal ligament (LP) with areas of bone resorption and presence of osteoclasts, indicated by the black arrows, in the groups OM (A) and IM (B), on the 2nd day after orthodontic device installation. OA, alveolar bone. (TRAP, magnification 400x).

**Table II.** Mean and standard deviation (SD) of the percentage of collagen type I and number of osteoclasts per square micron ( $\mu\text{m}^2$ ) of periodontal ligament (LP) in the vegetable oil (O), isotretinoin (I), vegetable oil and induced tooth movement (OM) and isotretinoin and induced tooth movement (IM)

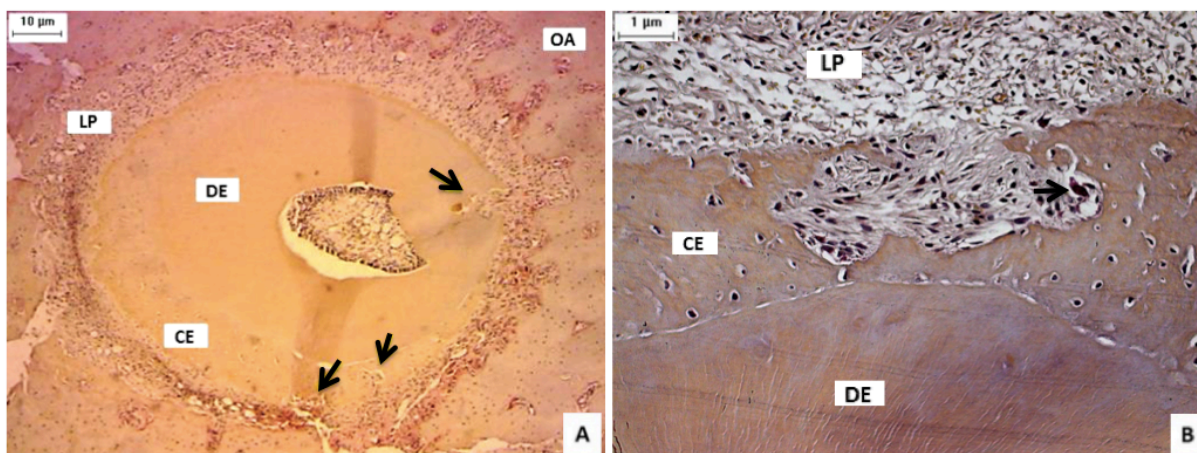
Group/ Variable	O (Mean $\pm$ SD)	I (Mean $\pm$ SD)	OM (Mean $\pm$ SD)	IM (Mean $\pm$ SD)	Comparison Games- Howell test		Power test
					OX I (P)*	OM X IM (P)*	
<b>Collagen type I</b>							
2 days	95.93 $\pm$ 3.29	91.33 $\pm$ 6.63	94.84 $\pm$ 4.59	89.29 $\pm$ 10.49	0.842	0.9556	
7 days	97.02 $\pm$ 2.61	93.38 $\pm$ 5.48	96.74 $\pm$ 1.13	90.35 $\pm$ 6.72	0.8382	0.0047*	0.9934
14 days	94.77 $\pm$ 2.35	91.83 $\pm$ 6.75	96.25 $\pm$ 2.22	96.82 $\pm$ 2.52	0.9866	0.9999	
21 days	97.74 $\pm$ 1.20	92.01 $\pm$ 4.84	96.39 $\pm$ 3.57	94.17 $\pm$ 5.93	0.0111*	0.9984	
<b>Osteoclasts per <math>\mu\text{m}^2</math> of LP</b>							
2 days	7.81 $\pm$ 1.96	8.18 $\pm$ 5.99	19.99 $\pm$ 3.77	19.60 $\pm$ 5.96	0.9999	0.9999	
7 days	6.52 $\pm$ 2.69	5.22 $\pm$ 1.83	11.49 $\pm$ 5.63	13.60 $\pm$ 3.98	0.9919	0.9995	0.9988
14 days	7.77 $\pm$ 2.35	8.36 $\pm$ 3.64	9.26 $\pm$ 4.94	9.89 $\pm$ 5.40	0.9999	0.9999	
21 days	6.29 $\pm$ 2.43	5.73 $\pm$ 1.61	8.34 $\pm$ 4.44	7.47 $\pm$ 2.61	0.9999	0.9999	

\*Significance level to Games-Howell test:  $P < 0.05$

## Root resorption

There was a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) in root resorption at the second, seventh, and 21st days between the OM and IM groups, based on the group  $\times$  time interaction (Table III, Fig 5).

On the second and 21st days, the mean number of cementoclasts was lower in the IM group compared to the OM group. On the seventh day, the number of cementoclasts was higher in the IM group compared to the OM group.



**Fig 5.** Photomicrography of the periodontal ligament (LP) with areas of root resorption and presence of cementoclasts, indicated by the black arrows, in the OM group on the 21st day after installation of the orthodontic device. OA, alveolar bone; DE, dentin and CE, cement. (TRAP, magnification 40x (A) and 400x (B)).

**Table III.** Means ( $10^{-6}$ ) and standard deviations (SD) of the number of cementoclasts per square micron ( $\mu\text{m}$ ) of periodontal ligament (LP) in the vegetable oil (O), isotretinoin (I), vegetable oil and induced tooth movement (OM) and isotretinoin and induced tooth movement (IM)

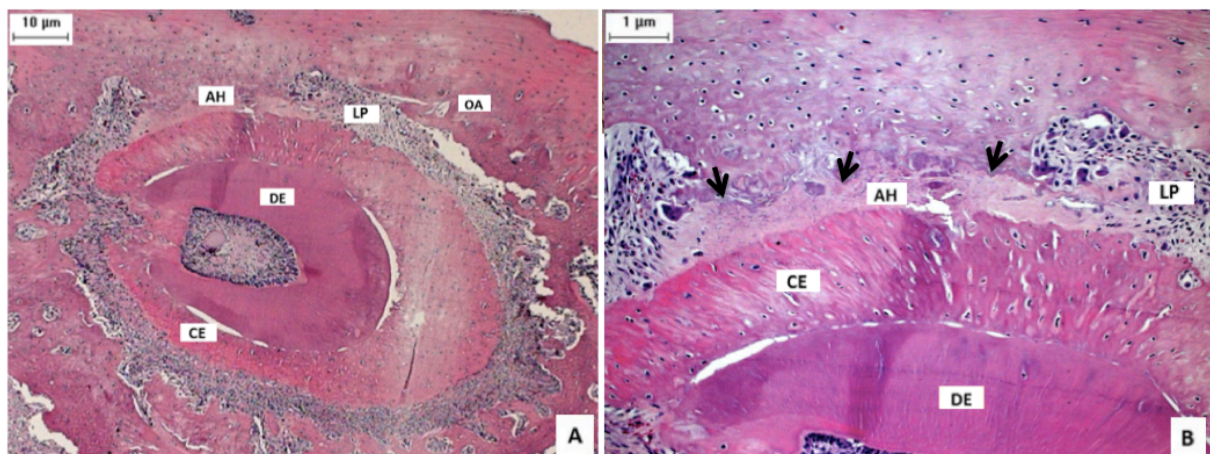
Groups/ Variables	O (Mean $\pm$ SD)	I (Mean $\pm$ SD)	OM (Mean $\pm$ SD)	IM (Mean $\pm$ SD)	Comparison Dunn Pairwise Method	
					OX I ( <i>P</i> )*	OM X IM ( <i>P</i> )*
Cementoclasts per $\mu\text{m}^2$ of LP						
2 days	1.31 $\pm$ 1.11	1.55 $\pm$ 0.25	1.53 $\pm$ 1.68	0.00 $\pm$ 0.00	0.3848	0.0074*
7 days	0.56 $\pm$ 1.04	0.89 $\pm$ 1.05	0.00 $\pm$ 0.00	1.86 $\pm$ 1.74	0.4205	0.0030*
14 days	0.77 $\pm$ 0.88	0.00 $\pm$ 0.00	2.18 $\pm$ 2.75	2.06 $\pm$ 3.63	0.0969	0.3982
21 days	1.68 $\pm$ 0.39	1.48 $\pm$ 0.27	4.16 $\pm$ 2.75	1.32 $\pm$ 1.61	0.6478	0.0048*

\*Significance level to Dunn test:  $P < 0.05$

### Hyaline area

There were no statistically significant differences, based on the group  $\times$  time interaction ( $P > 0.05$ ), in the presence of hyaline areas in the OM group at 2, 7, and 14 days, and in the IM group at 2, 14, and 21 days. The mean value of the percentage of hyaline area per square micron of the LP was 2.62 in the MI group and 2.92 in the OM group. No hyaline areas were observed in groups O and I.

Due to the small number of values found, the frequency analysis was used, considering the presence or absence of hyaline areas (Table IV, Fig 6).



**Fig 6.** Photomicrography of the periodontal ligament (LP) with presence of hyaline area (AH), indicated by the black arrows, in the OM group on the 7th day after orthodontic device installation. OA, alveolar bone; DE, dentin and CE, cement. (HE, magnification 40x (A) and 400x (B)).



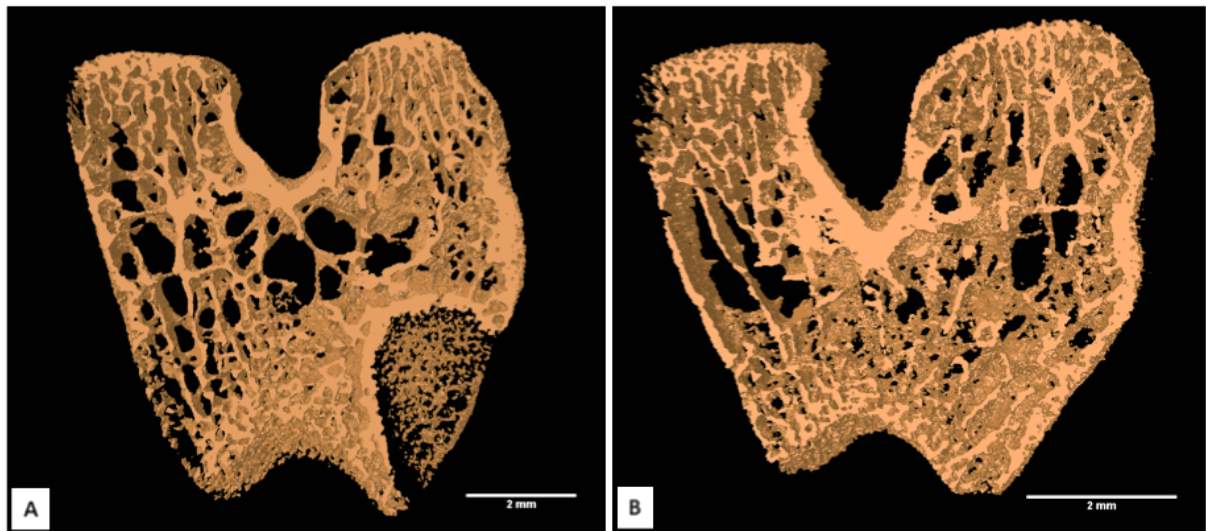
**Table IV.** Frequency of the presence of hyaline area (%) in the vegetable oil and induced tooth movement (OM) and isotretinoin and induced tooth movement (IM)

Group/ Variables	OM		IM	
	(n)	(%)	(n)	(%)
Hyaline area				
2 days	10	10.0 <sub>a</sub>	10	10.0 <sub>a</sub>
7 days	10	20.0 <sub>a</sub>	10	0.0 <sub>a</sub>
14 days	10	10.0 <sub>a</sub>	10	10.0 <sub>a</sub>
21 days	14	0.0 <sub>a</sub>	10	10.0 <sub>a</sub>

\*Significance level to Chi-Square test: similar letters indicate statistical similarity in the two-to-two comparison

### Computed tomography

No statistically significant differences ( $P > 0.05$ ) were observed in trabecular volume, trabecular thickness, trabecular separation, or trabecular number, based on the group  $\times$  time interactions (Table V, Fig 7).



**Fig 7.** Representative images of the three-dimensional reconstruction of the trabecular bone of the femur of the rats: (A) vegetable oil group and induced tooth movement (OM), and (B) isotretinoin group and induced tooth movement (IM) on the 7th day.

**Table V.** Mean and standard deviation (SD) of the variables: trabecular volume (BV /TV %), trabecular thickness (Tb.Th mm), trabecular separation (Tb.Sp mm) and trabecular number (Tb.N 1 / mm), in the vegetable oil (O), isotretinoin (I), vegetable oil and induced tooth movement (OM) and isotretinoin and induced tooth movement (IM)

Group/ Variables	O (Mean ± SD)	I (Mean ± SD)	OM (Mean ± SD)	IM (Mean ± SD)	Comparison Dunn Pairwise Method	
					OX I (P)*	OM X IM (P)*
<b>BV/TV</b>						
7 days	0.78 ± 0.11	0.69 ± 0.10	0.64 ± 0.20	0.71 ± 0.12	0.3415	0.7780
21 days	0.81 ± 0.04	0.88 ± 0.07	0.73 ± 0.07	0.77 ± 0.12	0.4149	0.6208
<b>Tb.Th</b>						
7 days	0.87 ± 0.21	0.66 ± 0.12	0.65 ± 0.19	0.84 ± 0.15	0.1710	0.2491
21 days	0.80 ± 0.12	0.99 ± 0.22	0.68 ± 0.13	0.82 ± 0.20	0.3757	0.2919
<b>Tb.Sp</b>						
7 days	0.24 ± 0.14	0.30 ± 0.12	0.39 ± 0.27	0.35 ± 0.18	0.4717	0.8879
21 days	0.19 ± 0.06	0.12 ± 0.05	0.25 ± 0.06	0.25 ± 0.16	0.3867	0.6960
<b>Tb.N</b>						
7 days	0.93 ± 0.18	1.05 ± 0.15	0.98 ± 0.13	0.85 ± 0.12	0.4063	0.2837
21 days	1.03 ± 0.16	0.93 ± 0.16	1.09 ± 0.14	0.97 ± 0.22	0.4624	0.3002

\*Significance level to Dunn test:  $P < 0.05$

## DISCUSSION

In the present study, tooth displacement, bone remodeling, and dental tissues were evaluated after ITM of the molars of rats that were administered isotretinoin, and it was verified that this drug exerted little influence on the analyzed structures.

The results of the present study showed that the medication used did not affect the displacement of the teeth in rats that underwent ITM. The P value was borderline when the OM and MI groups were compared across the evaluation periods. Although the size of the sample used may interfere with the value of P, the result found for the tooth displacement is compatible with the values found for the number of osteoclasts, since no difference was found in bone resorption in the present study. Nishio et al.<sup>23</sup> also found no difference in tooth displacement in rats administered isotretinoin; however, the authors performed tooth extraction, which makes it difficult to compare their findings with the present study. In contrast, Rohde et al.<sup>12</sup> reported that vitamin A has a direct effect on bones, causing demineralization or resorption, which were also found in the study by Conaway et al.<sup>36</sup>

In the present study, there was root resorption in the groups subjected to ITM. No studies were found that examined correlations between the use of isotretinoin and root resorption. On the second day, an inhibitory effect on root resorption was observed in the IM group compared to the OM group, and the mean number of cementoclasts was lower in the IM group. On the seventh day, however, the IM group presented greater root resorption compared to the OM group. This may have occurred because the time of exposure to the drug was greater than on day 2, associated with the peak in clastic cells, which usually occurs from the third to fifth day after the onset of ITM.<sup>13</sup> At the end of the observation period, on the 21st day, the IM group showed a decrease in root resorption compared to the OM group, indicating that there was a restrictive effect of isotretinoin at the end of the ITM, when the bone remodeling process was complete.<sup>13</sup> This finding may be positive for patients who use isotretinoin and undergo orthodontic treatment.

Type I collagen, synthesized and secreted by osteoblasts, makes up about 95% of the organic bone matrix. During bone resorption, this collagen is degraded, and in the process of repairing immature fibers, type III collagen is deposited.<sup>29,30</sup> Collagen neoformation begins between 5 and 7 days after ITM is initiated, with a peak between 5 and 10 days, and is complete at 14 and 21 days.<sup>13</sup> In the present study, it was possible to verify that isotretinoin decreased the amount of type I collagen fibers present in the newly formed bone matrix at 7 days, when comparing the IM and OM groups. However, when evaluated at 14 and 21 days, the groups were equivalent, indicating the recovery of the collagen maturation process, therefore showing no interference in the final phase of ITM. The findings of the present study differ from the study by Nishio et al,<sup>23</sup> in which ITM was evaluated in isotretinoin-treated rats after dental extraction, and the results showed that there was an acceleration in gingival repair after 7 days. Bergoli et al<sup>24</sup> also concluded that there was an acceleration in bone repair after dental extraction in rats.

In the present study, isotretinoin delayed the initial phase of bone neoformation, which then normalized throughout the process. This result corroborates the study by Frankel et al,<sup>9</sup> in which they concluded that vitamin A acts directly on embryogenic cartilage and bone, causing interference with the formation of collagen, consequently hindering the normal differentiation of osteoblasts and increasing the number of osteoclasts; this delays the process of new bone formation.



Tanaka et al<sup>17</sup> also showed that vitamin A influences the differentiation of osteoblasts and bone formation.

The results of the present study showed that the administration of isotretinoin at a dosage of 7.5 mg/kg, whether associated with ITM or not, did not influence the process of bone resorption, since the number of osteoclasts did not change significantly. In contrast, Lind et al<sup>6</sup> found that large amounts of vitamin A administered to rats led to accelerated mineral absorption by cortical and trabecular bone as a result of increased osteoclastic activity. Similarly, Scheven and Hamilton<sup>18</sup> concluded that isotretinoin antagonizes the ability of vitamin D to maintain normal serum calcium levels, which stimulates the formation of osteoclasts and suppresses osteoblastic activity, and may contribute to accelerated bone resorption in cases of excessive isotretinoin doses. The dose used in the present study and the time of application of the drug may have influenced the osteoclast numbers, once the dose used was not excessive.<sup>21,24,25</sup> However, the results of the present study corroborate the studies of Tekin et al<sup>19</sup> and DiGiovanna et al<sup>20</sup> in that no significant difference was found in bone mineral density in patients treated with a single cycle of 4 to 6 months of isotretinoin, with standard dosages of approximately 1 mg/kg/day.

In the present study, a dose of 7.5 mg/kg, used for a variable period of 32 to 51 days, was administered, depending on the observation period. This dose in rats produces serum levels of the drug comparable to those in humans who use isotretinoin at 1 mg/kg/day as a standard therapy.<sup>21,24,25</sup> As a standard treatment for cutaneous conditions in humans, isotretinoin is used in doses that vary from 0.5 to 2 mg/kg of body weight per day for a period of 5 months, totaling approximately 120 mg/kg of body weight at the end of the treatment.<sup>16,19,20</sup> The side effects of isotretinoin are dose- and duration-dependent, being directly related to the use of high doses for prolonged periods of time.<sup>7,21,22</sup>

In the present study, hyaline areas were observed in the groups subjected to ITM, independent of the administered solution; however, there was no difference between them. The greatest hyaline area was observed on the seventh day, although the applied force of 30 cN is considered mild, ideal for producing ITM in rats without causing undesirable effects.<sup>26</sup> Differences in the forces used for ITM in rats make it difficult to compare results between the studies by Nishio et al,<sup>23</sup> Gameiro et al,<sup>37</sup> and Hauber et al,<sup>38</sup> who used 50 cN. In the study by Hamaya et al,<sup>14</sup> in which ITM was evaluated without administration of drugs and 10 g of force was used, hyaline areas

decreased after the 7th day. Generally, when hyaline areas are present, their manifestation occurs 1-2 days after the onset of ITM, and so long as the applied force is not reactivated, these areas tend to undergo tissue repair after the seventh day.<sup>14</sup> In the present study, despite the fact that a highest amount of hyaline area was observed on the seventh day, the observed frequency of occurrence, considering the groups and times evaluated, was low.

To evaluate the possible changes caused by isotretinoin in the microarchitecture of the trabecular bone, microtomography was performed in the femurs of the rats studied. The femurs were analyzed to evaluate a possible systemic action of the drug in the bones, as observed in the study by Frigotto et al.<sup>27</sup> Isotretinoin did not produce relevant effects on trabecular bone in the present study. The increase in trabecular separation (Tb.Sp) is indicative of a decrease in bone quality, and suggests a possible imbalance in bone turnover.<sup>32,33</sup> However, the present study did not find differences in the evaluated aspects. The present result differs from the findings by Johansson and Melhus,<sup>11</sup> who performed computerized microtomography and concluded that isotretinoin, besides directly causing bone resorption, may indirectly cause a decrease in bone density due to interference with vitamin D actions.

Retinoids act as important modulating agents in bone.<sup>6,17</sup> Nishio et al<sup>23</sup> did not find significant changes in microtomography of bone trabeculation after the use of isotretinoin in rats, a result also found in the present study. However, the study by Lind et al<sup>6</sup> showed, through computerized microtomography, a significant reduction in bone density in the calvaria of rats. Tanaka et al<sup>17</sup> evaluated rat femurs by means of computerized microtomography, and concluded that vitamin A acts on osteoblastogenesis and bone formation.

The possible side effects associated with the increasing number of adolescents and young adults who use isotretinoin led some studies to question the true role of vitamin A and its excessive administration in humans.<sup>16,39</sup> It is noteworthy that it is during adolescence and the young adult phase that bone mineralization is actively acquired and its stored was maximized, this being also the average age of the patients who most frequently use isotretinoin in the treatment of severe acne,<sup>5</sup> and also those who are most often subjected to orthodontic treatment.<sup>23</sup>

In the present study, the effects of isotretinoin on ITM did not include significant changes in tooth displacement, bone remodeling, or microarchitecture of

trabecular bone in rats. Differences in dosage of the drug, the time of application of the drug, and the force used to perform ITM makes it difficult to compare the results of the present study with the other studies found. Further investigations with larger doses, longer times, and higher forces are required in ITM to verify the side effects of isotretinoin on the bone, since there is no consensus in the literature. Within the animal model used in the present study, it was observed that the medication, under the conditions employed, can be used during orthodontic treatment with safety.

## **CONCLUSIONS**

The use of isotretinoin at a dosage of 7.5 mg/kg during ITM in rats did not affect tooth displacement, collagen neoformation, bone resorption, presence of hyaline areas, or bone microarchitecture, and reduced root resorption.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Pontifícia Universidade Católica do Paraná for the partial financial support of this research.

## **REFERENCES**

1. Seité S, Caixeta C, Towersey L. Large-scale survey to describe acne management in Brazilian clinical practice. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2015;8:571-7.
2. Silverberg JI, Silverberg NB. Epidemiology and extracutaneous comorbidities of severe acne in adolescence: a U.S. population-based study. *Br J Dermatol*. 2014;170(5):1136-42.
3. Leyden JJ, Del Rosso JQ, Baum EW. The use of isotretinoin in the treatment of acne vulgaris: clinical considerations and future directions. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2014;7(2 Suppl):S3-S21.
4. Fleischer AB Jr, Simpson JK, McMichael A, Feldman SR. Are there racial and sex differences in the use of oral isotretinoin for acne management in the United States? *J Am Acad Dermatol*. 2003;49(4):662-6.
5. Kochhar DM, Christian MS. Tretinoin: a review of the nonclinical developmental toxicology experience. *J Am Acad Dermatol*. 1997;36(3 Pt 2):S47-59.


6. Lind T, Ohman C, Calounova G, Rasmusson A, Andersson G, Pejler G, Melhus H. Excessive dietary intake of vitamin A reduce skull bone thickness in mice. *PloS One*. 2017;12(4):e0176217.
7. Kindmark A, Rollman O, Mallmin H, Petrén-Mallmin M, Ljunghall S, Melhus H. Oral isotretinoin therapy in severe acne induces transient suppression of biochemical markers of bone turnover and calcium homeostasis. *Acta Derm Venereol*. 1998;78(4):266-9.
8. Silverman AK, Ellis CN, Voorhees JJ. Hypervitaminosis A syndrome: a paradigm of retinoid side effects. *J Am Acad Dermatol*. 1987;16(5 Pt 1):1027-39.
9. Frankel TL, Seshadri MS, McDowall DB, Cornish CJ. Hypervitaminosis A and calcium-regulating hormones in the rat. *J Nutr*. 1986;116(4):578-87.
10. Rohde CM, DeLuca H. All-trans retinoic acid antagonizes de action of calciferol and its active metabolite, 1,25-dihydroxycholecalciferol, in rats. *J Nutr*. 2005;135(7):1647-52.
11. Johansson S, Melhus H. Vitamin A antagonizes calcium response to vitamin D in man. *J Bone Miner Res*. 2001;16(10):1899-905.
12. Rohde CM, Manatt M, Clagett-Dame M, DeLuca HF. Vitamin A antagonizes the action of vitamin D in rats. *J Nutr*. 1999;129(12):2246-50.
13. Reitan K. Tissue behavior during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod*. 1960;46(12):881-900.
14. Hamaya M, Mizoguchi I, Sakakura Y, Yajima T, Abiko Y. Cell death of osteocytes occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. *Calcif Tissue Int*. 2002;70(2):117-26.
15. Heller IJ, Nanda R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod*. 1979;75(3):239-58.
16. Leachman SA, Insogna KL, Katz L, Ellison A, Milstone LM. Bone densities in patients receiving isotretinoin for cystic acne. *Arch Dermatol*. 1999;135(8):961-5.
17. Tanaka K, Tanaka S, Sakai A, Ninomiya T, Arai Y, Nakamura T. Deficiency of vitamin A delays bone healing process in association with reduced BMP2 expression after drill-hole injury in mice. *Bone*. 2010;47(6):1006-12.
18. Scheven BA, Hamilton NJ. Retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulate osteoclast formation by different mechanisms. *Bone*. 1990;11(1):53-9.

19. Tekin NS, Ozdolap S, Sarikava S, Keskin SI. Bone mineral density and bone turnover markers in patients receiving a single course of isotretinoin for nodulocystic acne. *Int J Dermatol.* 2008;47(6):622-5.
20. DiGiovanna JJ, Landman CB, Tschen EH, Jones T, Menter A, Lowe NJ et al. Effect of a single course of isotretinoin therapy on bone mineral density in adolescent patients with severe, recalcitrant, nodular acne. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51(5):709-17.
21. Ferguson SA, Cisneros FJ, Gough B, Hanig JP, Berry KJ. Chronic oral treatment with 13-cis-retinoic acid (isotretinoin) or all-trans-retinoic acid does not alter depression-like behaviors in rats. *Toxicol Sci.* 2005;87(2):451-9.
22. DiGiovanna JJ. Isotretinoin effects on bone. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45(5):S176-82.
23. Nishio C, Rompré P, Moldovan F. Effect of exogenous retinoic acid on tooth movement and periodontium healing following tooth extraction in a rat model. *Orthod Craniofac Res.* 2017;20 Suppl 1:77-82.
24. Bergoli RD, Chagas Junior OL, Souza CE, Vogt BF, Oliveira HT, Etges A, Silva DN. Isotretinoin effect on alveolar repair after exodontia – a study in rats. *Oral Maxillofac Surg.* 2011;15(2):85-92.
25. Oliveira HT, Bergoli RD, Hirsch WD, Chagas OL Jr, Heitz C, Silva DN. Isotretinoin effect on the repair of bone defects – a study in rat calvaria. *J Craniomaxillofac Surg.* 2013;41(7):581-5.
26. Ribeiro JS, Maciel JV, Knop LA, Machado MA, Gregio AM, Camargo ES. Effect of growth hormone in experimental tooth movement. *Braz Dent J* 2013;24(5):503-7.
27. Frigotto GCF, Araujo CM, Guariza Filho O, Tanaka OM, Johann ACBR, Camargo ES. Effect of fluoxetine on induced tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2015;148(3):450-6.
28. Retamoso L, Knop L, Shintcovsk R, Maciel JV, Machado MA, Tanaka O. Influence of anti-inflammatory administration in collagen maturation process during orthodontic tooth movement. *Microsc Res Tech* 2011;74(8):709-13.
29. Borges LF, Gutierrez PS, Marana HR, Taboga SR. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. *Micron* 2007;38(6):580-83.
30. Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int.* 1996;20(1):15-27.

31. Fracalossi ACC, Santamaria Jr M, Consolaro MFMO, Consolaro A. Experimental tooth movement in murines: study period and direction of microscopic sections. *Dent Press J Orthod* 2009;14(1):143-57.
32. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987;2(6):595-610.
33. Hildebrand T, Laib A, Muller R, Dequeker J, Ruegsegger P. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *J Bone Miner Res* 1999;14(7):1167-74.
34. Midtgard J, Bjork G, Linder-Aronson S. Reproducibility of cephalometric landmarks and errors of measurements of cephalometric cranial distances. *Angle Orthod* 1974;44(1):56-61.
35. Houston WJ. The analysis of errors in orthodontic measurements. *Am J Orthod* 1983;83(5):382-90.
36. Conaway HH, Henning P, Lerner UH. Vitamin A metabolism, action, and role in skeletal homeostasis. *Endocr Rev.* 2013;34(6):766-97.
37. Gameiro GH, Nouer DF, Pereira-Neto JS, de Araújo Magnani MB, de Andrade ED, Novaes PD, de Arruda Veiga MC. Histological analysis of orthodontic root resorption in rats treated with the cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor celecoxib. *Orthod Craniofac Res.* 2008;11(3):156-61.
38. Hauber Gameiro G, Nouer DF, Borges De Araújo Magnani MB, Duarte Novaes P, Bovi Ambrosano GM, Da Silva Andrade A, Ferraz De Arruda Veiga MC. *Minerva Stomatol.* 2008;57(11-12):569-75.
39. Penniston KL, Tanumihardjo SA. Vitamin A in dietary supplements and fortified foods: too much of a good thing? *J Am Diet Assoc.* 2003;103(9):1185-7.

**ANEXO**

## Anexo I - Parecer do comitê de ética no uso de animais – PUCPR



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética em Pesquisa

Curitiba, 11 de Dezembro de 2014.

### PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

**REGISTRO DO PROJETO:** 0935 – 2ª Versão

**TÍTULO DO PROJETO:** Influência do uso da isotretinoína no movimento ortodôntico em ratos wistar.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Ariane Ximenes Graciano Parra

**EQUIPE DE PESQUISA:** Ariane Ximenes Graciano Parra, Elisa Souza Camargo, Ana Maria Trindade Gregio.

**INSTITUIÇÃO:** \_\_\_\_\_  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**ESCOLA / CURSO:** \_\_\_\_\_  
Escola de Saúde e Biociências - Doutorado

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
<i>Rattus norvegicus</i>	M	6 a 8 semanas 200 – 250 g	C/ Mediato	170 <small>(Liberados em 11.12.2014)</small>

O colegiado do CEUA em reunião no dia **11.12.2014**, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer:


**APROVADO.**

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.


Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

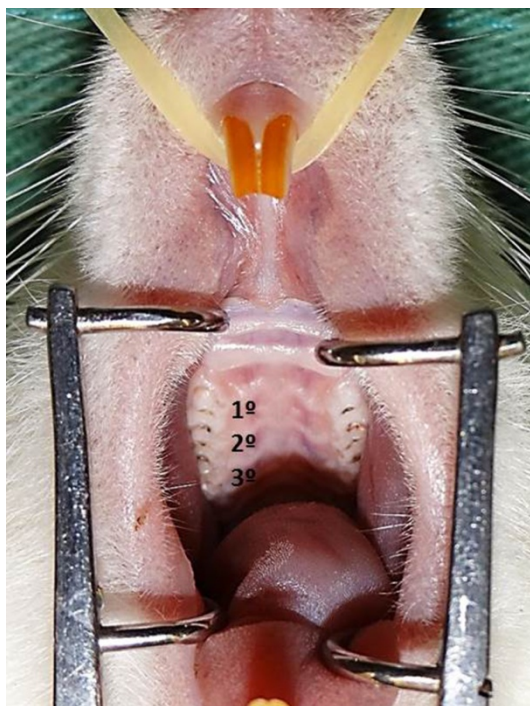


**Prof. Dra. Marta Luciane Fischer**  
Coordenadora - Comitê de Ética no Uso de Animais.

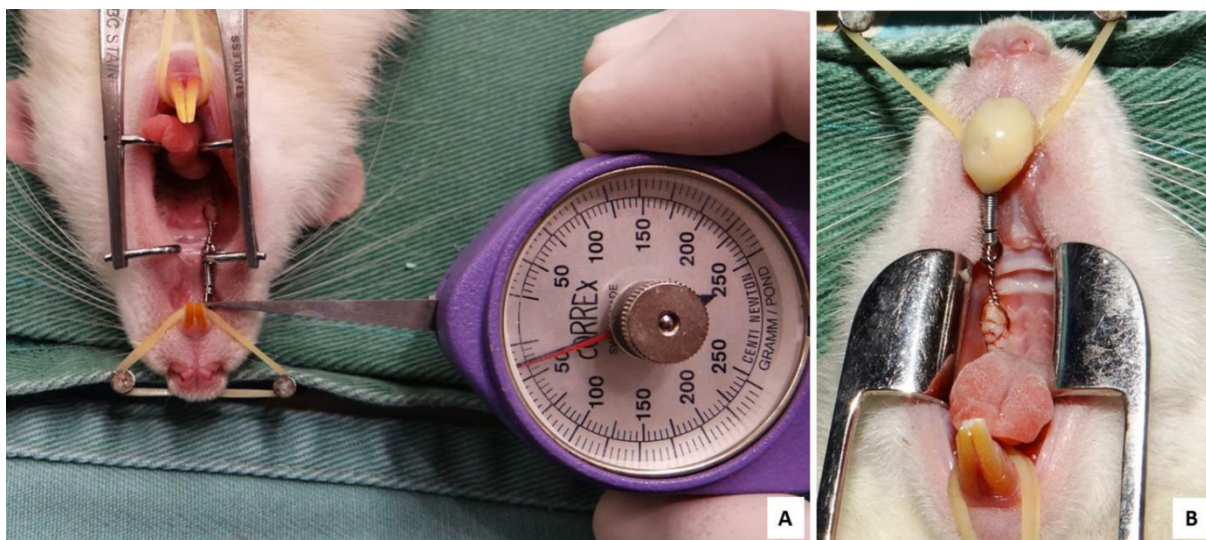




## Anexo II – Metodologia complementar



**Fig 1.** Arcada superior do animal da amostra indicando 1º, 2º e 3º molares superiores direitos.



**Fig 2.** (A) Padronização, com tensiômetro, da força de 30cN empregada na mola fechada. (B) Dispositivo ortodôntico instalado e reforço de resina composta nos incisivos superiores.

**Anexo III-** Normas para publicação - American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics

**Information for Authors**

**Electronic manuscript submission and review**

*The American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics uses the Elsevier Editorial System (EES), an online manuscript submission and review system.*

*To submit or review an article, please go to the AJO-DO EES website:*

*<http://ees.elsevier.com/ajodo>.*

*Send correspondence to:*

*Rolf G. Behrents, Editor-in-Chief*

*E-mail: behrents@slu.edu*

*Send other correspondence to:*

*Chris Burke, Managing Editor*

*American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*

*University of Washington*

*Department of Orthodontics, D-569*

*HSC Box 357446*

*Seattle, WA 98195-7446*

*Telephone (206) 221-5413*

*E-mail:ckburke@aol.com*

**General Information**

*The American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics publishes original research, reviews, case reports, clinical material, and other material related to orthodontics and dentofacial orthopedics.*

*Submitted manuscripts must be original, written in English, and not published or under consideration elsewhere. Manuscripts will be reviewed by the editor and consultants and are subject to editorial revision. Authors should follow the guidelines below.*

*Statements and opinions expressed in the articles and communications herein are those of the author(s) and not necessarily those of the editor(s) or publisher, and the editor(s) and publisher disclaim any responsibility or liability for such material. Neither the editor(s) nor the publisher guarantees, warrants, or endorses any product*

*or service advertised in this publication; neither do they guarantee any claim made by the manufacturer of any product or service. Each reader must determine whether to act on the information in this publication, and neither the Journal nor its sponsoring organizations shall be liable for any injury due to the publication of erroneous information.*

### **Guidelines for Original Articles**

*Submit Original Articles via EES: [ees.elsevier.com/ajodo](http://ees.elsevier.com/ajodo).*

*Before you begin, please review the guidelines below. To view a 7-minute video explaining how to prepare your article for submission, go to [Video on Manuscript Preparation](#).*

- 1. Title Page. Put all information pertaining to the authors in a separate document. Include the title of the article, full name(s) of the author(s), academic degrees, and institutional affiliations and positions; identify the corresponding author and include an address, telephone and fax numbers, and an e-mail address. This information will not be available to the reviewers.*
- 2. Abstract. Structured abstracts of 200 words or less are preferred. A structured abstract contains the following sections: Introduction, describing the problem; Methods, describing how the study was performed; Results, describing the primary results; and Conclusions, reporting what the authors conclude from the findings and any clinical implications.*
- 3. Manuscript. The manuscript proper should be organized in the following sections: Introduction and literature review, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, and figure captions. Express measurements in metric units, whenever practical. Refer to teeth by their full name or their FDI tooth number. For style questions, refer to the AMA Manual of Style, 9th edition. Cite references selectively, and number them in the order cited. Make sure that all references have been mentioned in the text. Follow the format for references in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997;126:36-47); <http://www.icmje.org>. Include the list of references with the manuscript proper. Submit figures and tables separately (see below); do not embed figures in the word processing document.*

4. *Figures.* Digital images should be in TIF or EPS format, CMYK or grayscale, at least 5 inches wide and at least 300 pixels per inch (118 pixels per cm). Do not embed images in a word processing program. If published, images could be reduced to 1 column width (about 3 inches), so authors should ensure that figures will remain legible at that scale. For best results, avoid screening, shading, and colored backgrounds; use the simplest patterns available to indicate differences in charts. If a figure has been previously published, the legend (included in the manuscript proper) must give full credit to the original source, and written permission from the original publisher must be included. Be sure you have mentioned each figure, in order, in the text.

5. *Tables.* Tables should be self-explanatory and should supplement, not duplicate, the text. Number them with Roman numerals, in the order they are mentioned in the text. Provide a brief title for each. If a table has been previously published, include a footnote in the table giving full credit to the original source and include written permission for its use from the copyright holder. Submit tables as text-based files (Word or Excel, for example) and not as graphic elements.

6. *Model release and permission forms.* Photographs of identifiable persons must be accompanied by a release signed by the person or both living parents or the guardian of minors. Illustrations or tables that have appeared in copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the copyright owner and original author, and the legend must properly credit the source. Permission also must be obtained to use modified tables or figures.

7. *Copyright release.* In accordance with the Copyright Act of 1976, which became effective February 1, 1978, all manuscripts must be accompanied by the following written statement, signed by all authors:

"The undersigned author(s) transfers all copyright ownership of the manuscript **[insert title of article here]** to the American Association of Orthodontists in the event the work is published. The undersigned author(s) warrants that the article is original, does not infringe upon any copyright or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, has not been previously published, and includes any product that may derive from the published journal, whether print or electronic media. I (we) sign for and accept responsibility for releasing this material."  
Scan the printed copyright release and submit it via EES.

8. Use the International College of Medical Journal Editors Form for the Disclosure of Conflict of Interest (ICMJE Conflict of Interest Form). If the manuscript is accepted, the disclosed information will be published with the article. The usual and customary listing of sources of support and institutional affiliations on the title page is proper and does not imply a conflict of interest. Guest editorials, Letters, and Review articles may be rejected if a conflict of interest exists.

9. Institutional Review Board approval. For those articles that report on the results of experiments of treatments where patients or animals have been used as the sample, Institutional Review Board (IRB) approval is mandatory. No experimental studies will be sent out for review without an IRB approval accompanying the manuscript submission.

### **Checklist for authors**

- Title page, including full name, academic degrees, and institutional affiliation and position of each author, and author to whom correspondence and reprint requests are to be sent, including address, business and home phone numbers, fax numbers, and e-mail address
- Abstract
- Article proper, including references and figure legends
- Figures, in TIF or EPS format
- Tables
- Copyright release statement, signed by all authors
- Photographic consent statement(s)
- ICMJE Conflict of interest statement
- Permissions to reproduce previously published material