

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ORTODONTIA

CRISTINA HEPP

A INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO NA MOVIMENTAÇÃO
ORTODÔNTICA EM RATOS

CURITIBA

2010

CRISTINA HEPP

**A INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO NA MOVIMENTAÇÃO
ORTODÔNTICA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ortodontia.

Pós-graduanda: Cristina Hepp

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Souza Camargo

CURITIBA

2010

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Antonio Carlos Hepp, por sempre me mostrar o caminho certo, fazer com que eu nunca desista dos meus sonhos, mostrar que com dedicação tudo é possível. Sempre presente na minha vida, como pai e mestre, sempre seguirei seus conselhos e passos, você é meu exemplo de vida. Obrigada por todo o amor e tudo o que fez e ainda fará por mim.

À minha mãe, Irene Maria Gieburowski Hepp, por todo o amor que me foi dado, sempre me ajudando nas situações mais difíceis da minha vida, companheira, amiga e mãe. Sempre colocando os filhos em primeiro lugar. Obrigada por tudo que faz por mim, por estar presente em todos os momentos da minha vida e por ser um exemplo de mãe, de amor e de vida.

À minha irmã, Luciana Hepp, pelo companheirismo diário, ajuda quando necessária e paciência em todos os momentos. Sempre disposta a me escutar e dar conselhos. Obrigada pela alegria, amor e amizade verdadeira.

Ao meu irmão Ricardo Hepp, pela compreensão nos momentos de “desespero”, ajuda, amor e alegria. Sempre deixando-me confiante, fazendo-me rir quando tudo parecia perdido. Obrigada por fazer parte desta grande conquista.

Ao meu avô, Tadeusz Zygmund Gieburowski, exemplo de vida, amor e conhecimento, que entendeu a minha ausência, sempre me incentivando nos estudos. Obrigada pela compreensão, carinho e amor.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Elisa Souza Camargo, que com muita paciência soube me ensinar desde os pequenos aos grandes detalhes. É um exemplo de pessoa e de mestre que quero seguir no meu caminho. Obrigada por toda dedicação, confiança, amor, apoio que me foi dado. Principalmente por sempre estar disposta a me ajudar e pela pessoa maravilhosa que é, além de orientadora, se tornou uma amiga.

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar. Por estar sempre ao meu lado, iluminando meus passos e minhas decisões. Nos momentos mais difíceis Tu esteves comigo e me carregou no colo. Nos momentos felizes e de conquistas sei que vibrou comigo. Fez com que eu crescesse em todos os momentos. Obrigada por simplesmente existir.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), pela oportunidade de realizar este Curso de Mestrado, colaborando com meu desenvolvimento profissional.

Ao coordenador do programa de Pós-Graduação em Odontologia na PUCPR, Prof. Dr. Sérgio Vieira, meu agradecimento pela atenção sempre dispensada.

Pelo saber transmitido nesses dois anos, aos professores do programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração Ortodontia da PUCPR, Elisa Souza Camargo, Hiroshi Maruo, Odilon Guariza Filho e Orlando Motohiro Tanaka.

Prof. Dr. Hiroshi Maruo muito obrigada pelos ensinamentos transmitidos que contribuíram muito em minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Odilon Guariza Filho, por todo o carinho e paciência ao ensinar cada detalhe da Ortodontia, muito obrigada pela dedicação e pela amizade que construímos.

Ao Prof. Dr. Orlando Motohiro Tanaka, exemplo de mestre, com certeza seguirei seus conselhos e conhecimentos. Muito obrigada por todo ensinamento transmitido, paciência e amizade.

Aos membros da banca do Exame de Qualificação, Profa. Dra. Ana Maria Trindade Grégio, Prof. Dr. Orlando Motohiro Tanaka e Prof. Dr. Odilon Guariza Filho pela contribuição na análise deste trabalho.

Ao Prof. José Vinicius Bolognesi Maciel, pela atenção, carinho e apoio. Sempre presente, esclarecendo dúvidas, foi fundamental para a realização deste trabalho, nunca negando ajuda e sempre compartilhando conhecimento.

À Profa. Dra. Aline Cristina Batista Rodrigues Johann, pela ajuda com a interpretação dos resultados obtidos no trabalho e principalmente pela paciência.

Ao Prof. Dr. Sérgio Aparecido Ignácio, pela orientação estatística, com muita paciência explicando os resultados obtidos.

Ao funcionário Misael Gomes Barbosa, por toda a contribuição durante a parte experimental do trabalho.

Ao Biotério da PUCPR, de modo especial ao zootecnista Rafael Zotz, que com extrema gentileza e disponibilidade ofereceram suporte para a obtenção e manutenção dos animais utilizados neste trabalho.

À Profa. Dra. Lúcia de Noronha e às funcionárias do Laboratório de Patologia Experimental Ana Paula Camargo Martins e Marina Luise Viola de Azevedo pela atenção e dedicação no processo laboratorial.

Aos meus colegas de turma Alinne Ulbrich Mores Rymovicz, Ana Leticia Rocha Avila, Denise Odete Manarelli, Dolores Fátima Campos Navarro, Gabriela Pinto Molina da Silva, Ismael Signori, Lilian Mary Karakida, Maiara Medeiros Ronsani, Maria Cecilia Galacini Añez e Thiago Martins Meira, pelo companheirismo que tivemos diariamente, por toda ajuda e disposição para me ajudar quando precisei. Obrigada pela amizade que tivemos. Momentos inesquecíveis irão ficar marcados para sempre em minha vida, sentirei saudades.

À secretária Neide Reis Borges e aos demais funcionários da Clínica de Odontologia da PUCPR, pelo apoio oferecido.

Aos meus amigos de Concórdia e de Curitiba que entenderam a minha ausência e me incentivaram em todos os momentos a realizar este curso de Mestrado. Obrigada pelo carinho e compreensão.

Ao Sílvio Luís Dalagnol por me indicar e incentivar a fazer o Mestrado de Ortodontia PUCPR e pelos dias cedidos no seu consultório para acompanhar o seu trabalho.

Aos meus tios, tias, primos e primas que me deram apoio moral, confiança e ajuda quando precisei.

À minha tia, Maria Isabela Guebur, pelo apoio, carinho e pelos dias cedidos no consultório.

Ao meu tio, Luiz Alberto Hepp, pelo carinho e disposição quando precisei.

À minha prima, Virginia Hepp, pela amizade, ajuda e por sempre estar ao meu lado quando precisei.

Aos pacientes da clínica de Ortodontia pela confiança em nosso atendimento.

Aos alunos do 7º e 8º períodos do curso de Odontologia da PUCPR, pela oportunidade da vivência na ação docente.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

SUMÁRIO

1. ARTIGO EM PORTUGUÊS	02
PÁGINA TÍTULO	03
RESUMO	04
INTRODUÇÃO	05
MATERIAL E MÉTODOS	06
RESULTADOS	09
DISCUSSÃO	12
CONCLUSÃO	16
REFERÊNCIAS	17
FIGURAS	21
TABELAS	22
2. ARTIGO EM INGLÊS	24
TITLE PAGE	25
ABSTRACT	26
INTRODUCTION	27
MATERIAL AND METHODS	28
RESULTS	31
DISCUSSION	34
CONCLUSION	38
REFERENCES	39
FIGURES	43
TABLES	44
3. ANEXOS	46
ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	47
ANEXO 2 – MÉTODO	48
ANEXO 3 – ILUSTRAÇÕES	56
ANEXO 4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
ANEXO 5 – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO <i>AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS</i>	63

1. ARTIGO EM PORTUGUÊS

PÁGINA TÍTULO

A influência do hormônio de crescimento na movimentação ortodôntica em ratos

Cristina Hepp,^a Elisa Souza Camargo^b

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de concentração em Ortodontia
Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

^aAluna de pós-graduação, Departamento de Ortodontia

^bProfessora adjunta, Departamento de Ortodontia

Autor para correspondência: Elisa Souza Camargo, Professora Adjunta da
Graduação e Pós-Graduação de Ortodontia, Rua Fernando Simas, 327 / CEP:
80.430-190 – Curitiba-PR – Brasil / Fone/Fax: 55 41 33235835 / Res: 55 41
32434907 / e-mail: elisa.camargo@pucpr.br

RESUMO

A influência do hormônio de crescimento na movimentação ortodôntica em ratos

Introdução: O hormônio de crescimento (HC) participa no processo de remodelação óssea e a sua deficiência ou excesso pode interferir nas respostas teciduais decorrentes das forças ortodônticas. Objetivou-se avaliar histologicamente no ligamento periodontal o efeito da movimentação ortodôntica sob administração crônica do HC. **Método:** Amostra de 65 ratos *Wistar*, divididos em três grupos: SA (SAIZEN® 0,1 UI/kg/dia por 30 dias, sem movimento dentário), C (controle, com movimento dentário) e E (experimental, SAIZEN® 0,1 UI/kg/dia por 30 dias e até a morte, com movimento dentário). Os grupos C e E receberam força ortodôntica (50cN) aplicada no 1º molar superior direito, seguida da morte dos animais nos períodos de 1, 2, 3, 5, 7 e 14 dias. Os cortes histológicos obtidos foram corados por hematoxilina-eosina, avaliados em microscopia de luz e realizada análise qualitativa e quantitativa nas áreas de compressão e tração do ligamento periodontal. **Resultados:** Games-Howell verificou que o Grupo E apresentou maior número de osteoclastos no 2º dia ($p < 0,05$), e de lacunas de *Howship* nos 2º e 3º dias e de vasos sangüíneos a partir do 3º dia, não estatisticamente significantes ($p > 0,05$), quando comparados com o grupo C. **Conclusão:** O uso crônico do hormônio de crescimento antecipou e intensificou a reabsorção óssea durante a movimentação ortodôntica em ratos.

INTRODUÇÃO

O hormônio de crescimento (HC) tem indiscutíveis efeitos biológicos, dos quais sobressaem as ações anabólicas,¹ sendo uma das mais importantes substâncias reguladoras da remodelação e do crescimento ósseo.²

Este hormônio tem sido amplamente utilizado, para o tratamento de crianças com pequeno peso ao nascer em relação à idade gestacional e crescimento insuficiente até os dois anos de idade, como substituto em crianças com deficiência deste hormônio e em adultos com deficiência ou insuficiência de HC e perda de peso corporal por AIDS. Outras indicações, com eficácia e segurança não estabelecidas, incluem pacientes com condições de severo catabolismo, fibrose cística, doença inflamatória intestinal, problemas de fertilidade, osteoporose e síndrome de Down,³ assim como a redução da gordura visceral em mulheres pós-menopáusicas.⁴

Além disso, o HC é usado por pessoas que desejam reverter efeitos do envelhecimento e para promover melhor desempenho esportivo, sendo estes considerados usos inapropriados e excessivos de HC, não havendo evidências que mostrem sua eficácia.⁵ O emprego de HC para aumentar a estatura de crianças com altura normal também é considerado um abuso.³

A movimentação dentária induzida é um processo biológico múltiplo, caracterizado por reações seqüenciais do tecido periodontal em resposta às forças aplicadas. Os estímulos provocados geram alterações teciduais que, em conjunto com a ativação de mediadores químicos, resultam na remodelação óssea.⁶ Tais reações teciduais estão associadas a fatores locais relacionados aos dentes e à oclusão, e também a fatores sistêmicos relacionados ao metabolismo ósseo.⁷

Alguns fármacos podem afetar este metabolismo, como os antidepressivos tricíclicos,⁸ o clodronato,⁹ os antibióticos,¹⁰ os antiinflamatórios não esteróides¹² e alguns hormônios¹³ que reduzem a reabsorção óssea, e os antiinflamatórios esteróides,¹⁴ corticosteróides e outros hormônios¹³ que a aceleram.

Uma vez que uma série de evidências indica como importante função do HC a manutenção da massa óssea em adultos¹⁵ e a participação no processo de

remodelação óssea ao estimular os osteoblastos¹⁶ e osteoclastos durante a aposição e reabsorção óssea, respectivamente,¹⁷ a presença deste fármaco também poderia afetar as respostas teciduais frente a uma força ortodôntica.

São escassos na literatura os trabalhos que relacionam o uso do HC com o movimento dentário induzido. Considerando-se que muitos pacientes em tratamento ortodôntico podem estar utilizando este hormônio como suplemento visando melhora estética ou atlética, justifica-se pesquisar esta possível interação.

Objetivou-se desta forma, avaliar o efeito do HC no ligamento periodontal de ratos submetidos ao movimento dentário induzido.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob parecer nº428.

Foram utilizados 65 ratos machos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvergicus albinus*) com 9 semanas de vida, pesando aproximadamente 300 – 350g, fornecidos e mantidos pelo Biotério da PUCPR. Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas, com temperatura entre 19°C e 22°C e fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro para evitar alterações no ciclo metabólico. Foram fornecidos água e ração triturada *ad libitum*.

Distribuição da Amostra (Quadro 1, pág 8):

Os animais foram distribuídos em três grupos, o grupo SA (hormônio de crescimento, SAIZEN®), o C (controle) e o E (experimental), com a finalidade de caracterizar a evolução da resposta biológica ao movimento dentário induzido:

- Grupo SA - composto por 05 animais, sob administração crônica do hormônio de crescimento SAIZEN® 1,33 mg (4UI) - 0,1UI de HC/kg/dia durante 30 dias, mortos no 31º dia, sem movimento dentário induzido.
- Grupo C - composto por 30 animais, mortos após 1, 2, 3, 5, 7 e 14 dias de movimento dentário induzido com força de 50cN.
- Grupo E - composto por 30 animais, sob administração crônica do hormônio de crescimento SAIZEN® 1,33 mg (4UI) - 0,1UI de HC/kg/dia durante 30 dias até o momento da morte do animal, após 1, 2, 3, 5, 7 e 14 dias de movimento dentário induzido, com força de 50cN.

O HC selecionado foi o SAIZEN® 1,33 mg (4UI) (Serono Prods. Farms. Ltda. - Somatropina (r-hGH) - (Lote Y06A1957, Fabricação: 02/09, Validade: 01/11, Registro 1.1124.0184, Laboratoires Serono, Aubonne, Suisse) e a dosagem utilizada foi 0,1UI de HC/kg/dia.¹⁸ Foram realizadas aplicações diárias deste hormônio, sempre no mesmo horário,¹⁹ pela manhã, via subcutânea na região abdominal alternando entre os lados direito e esquerdo.

Quadro 1. Distribuição da Amostra

Grupos	Número de Ratos	Movimento Dentário Induzido	Período de Administração do HC - SAIZEN®	Dia da Morte
SAIZEN® (SA)	5	Não	31 dias	31
Controle (C)	30	1 dia	Não	31
		2 dias	Não	32
		3 dias	Não	33
		5 dias	Não	35
		7 dias	Não	37
		14 dias	Não	44
Experimental (E)	30	1 dia	31 dias	31
		2 dias	32 dias	32
		3 dias	33 dias	33
		5 dias	35 dias	35
		7 dias	37 dias	37
		14 dias	44 dias	44

O movimento dentário foi induzido por meio de dispositivo ortodôntico que consistia de uma mola fechada de níquel-titânio (3M Unitek®, St. Paul - MN - USA), construído a partir do modelo proposto por Heller e Nanda,²⁰ e fio de amarrilho de aço inoxidável com 0,020 polegadas (MORELLI® - Dental Morelli Ltda, Sorocaba - SP - Brasil) para fixação da mola no primeiro molar superior direito e nos incisivos superiores. Esta mola foi posicionada na distal do incisivo superior direito, para evitar a rotação do primeiro molar direito, que produziu força recíproca com magnitude de 50cN, mensurada por um dispositivo previamente calibrado.

Para a instalação do acessório ortodôntico os animais foram sedados com solução anestésica Tiletamina/Zolazepam (Zoletil 50®, Brasil Indústria e Comércio Ltda, Jurubatuba - SP - Brasil), na dosagem de 50mg/kg de peso corporal e média de volume de 0,25 mL/animais. Este anestésico foi injetado via intramuscular.

Os animais foram mortos por dose excessiva de solução anestésica (Quetamina 5,4mL/kg), via intraperitoneal. Após dissecação e corte da hemiarcada superior direita, os espécimes foram fixados em formalina 10% tamponada por 72 horas e desmineralizados em solução de EDTA 4,13% por aproximadamente 12 semanas. Obtida a desmineralização, foram realizados cortes transversais dos espécimes no terço cervical do 1º molar, com espessura de 5µm.

Os cortes obtidos foram corados pelo método Hematoxilina-Eosina (HE) de Harris e Lison, que permitiu realizar análise qualitativa para observar a disposição

das fibras colágenas (FC), a morfologia dos fibroblastos (FB) e a presença de reabsorção solapante (RS) no ligamento periodontal (LP) da raiz intermediária vestibular e verificar se havia a presença de áreas hialinas (AH) em todas as raízes do 1º molar; e análise quantitativa para reconhecer e quantificar os osteoclastos (OC), lacunas de *Howship* (LH) e vasos sanguíneos (VS) presentes ao longo do LP da raiz intermediária vestibular deste dente. O primeiro molar superior do rato pode apresentar de quatro a seis raízes, na maioria das vezes cinco raízes, denominadas: mesiovestibular, mesiolingual, intermediária vestibular, distovestibular e distolingual.²¹ As áreas de compressão e de tração avaliadas na presente pesquisa foram respectivamente, a face mesial e a face distal da raiz intermediária vestibular.

As lâminas foram analisadas sob microscopia de Luz (Olympus, BX 40), com aumento original de 400X. O critério histológico utilizado para identificar células osteoclásticas foi a presença de células eosinofílicas e multinucleadas adjacentes à superfície do osso alveolar.²² As análises foram realizadas por um único operador devidamente calibrado que desconhecia o grupo a que cada lâmina pertencia.

Na análise estatística, visando comparar os grupos entre si, foi aplicado o teste ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Games-Howell para variâncias heterogêneas, e para verificar se havia correlação entre as variáveis OC, LH e VS, utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson.²³

RESULTADOS

ANÁLISE QUALITATIVA

- **Grupo SAIZEN® (SA - com HC, sem movimento dentário)**

Nas lâminas do grupo SA observou-se predomínio de FB fusiformes, feixes de FC organizadas, estiradas e paralelas entre si tanto na face mesial quanto na distal e

presença de escassos OC e LH, e numerosos VS (Fig 1, A e 1, B; pág 21). Não havia presença de AH, nem de RS.

- **Grupo controle (C - movimento dentário, sem HC)**

Nos 1^o e 2^o dias, na área de compressão, verificou-se LP com predomínio de FB ovóides, feixes de FC desorganizados e compressão dos VS. Foi observada pequena quantidade de OC localizados no interior das LH e contíguos à superfície óssea com escassa vascularização (Fig 4, A e E; pág 56). Na área de tração o LP encontrava-se com predomínio de FB fusiformes, com feixes de FC estirados, oblíquos e paralelos entre si e VS dilatados (Fig 4, C e G; pág 56).

Os eventos intensificaram-se nos 3^o e 5^o dias, sendo observado na área de compressão, aumento da desorganização das FC (Fig 4, I e 5, A; págs 56 e 57). As quantidades de OC localizados no interior das LH aumentaram, assim como a quantidade de VS (Fig 4, I e 5, A; págs 56 e 57).

Após a fase inicial do movimento dentário, a partir do 7^o dia ao 14^o dia houve diminuição na quantidade dos OC, assim como das LH e de VS (Fig 5, E, G, I e K; pág 57). No 14^o dia os feixes de FC no lado de tração mantinham-se organizados (Fig 5, K; pág 57) enquanto no lado de compressão dispunham-se de maneira desorganizada (Fig 5, I; pág 57), contudo, não mais numa forma exacerbada como visto nos tempos anteriores, encontrando-se então, o LP com tendência à normalidade.

- **Grupo experimental (E - com movimento dentário, com HC)**

Nos 1^o e 2^o dias, as áreas de compressão e tração apresentaram quantidade moderada de VS (Fig 4, B, D, F e H; pág 56). Na área de compressão observaram-se predomínio de FB ovóides e feixes de FC desorganizadas, enquanto que na área de tração, permeados por FB fusiformes, os feixes encontravam-se estirados, oblíquos e paralelos entre si (Fig 4, B; pág 56).

No 2º dia o LP exibiu numerosos OC contíguos à superfície do osso alveolar, atingindo seu auge, que foi maior que no grupo C (Fig 2, A e B; pág 21), demonstrando intensa atividade reabsortiva (Fig 4, F e H; pág 56). O número de VS aumentou no 3º dia (Fig 4, J e L; pág 56).

Nos 5º, 7º e 14º dias houve diminuição gradativa no número de OC, assim como das LH (Fig 5, B, D, F, H, J e L; pág 57). O número de VS permaneceu constante até o 7º dia, e apresentou pequena diminuição no 14º dia.

A forma dos FB e a disposição das FC permaneceram semelhantes aos dias anteriores. No 14º dia as FC no lado de tração mantinham-se organizadas (Fig 5, D, H e L; pág 57) enquanto no lado de compressão dispunham-se de maneira desorganizada, contudo, com menor intensidade em relação aos tempos anteriores (Fig 5, B, F e J; pág 57), encontrando-se o LP, com tendência à normalidade.

Verificou-se a presença de RS nos grupos C e E em todos os dias analisados (Fig 6, A; pág 58) e de AH principalmente nas raízes disto-palatinas e disto-vestibulares nos grupos C e E desde o 1º dia até o 7º dia (Fig 6, B; pág 58). Porém não foi observada a presença de cementoclastos em nenhum dos grupos analisados.

ANÁLISE QUANTITATIVA

Os resultados da análise quantitativa, as médias, desvios-padrão e valores p obtidos estão descritos na Tabela I (pág 22).

Nos 1º, 3º, 5º, 7º e 14º dias após a indução do movimento dentário, o teste de Games-Howell de comparações múltiplas não identificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos C x E em relação aos OC, LH e VS (Tabela I, pág 22).

No 2^o dia, notou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos C x E ($p < 0,05$) no que diz respeito aos OC, que apresentou média e desvio-padrão 5.6 e 3.29, respectivamente, no grupo C, e 15 e 6.63 no grupo E. Em relação às LH e aos VS não identificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos C x E (Tabela I, pág 22).

Ao analisar os valores médios das variáveis OC, LH e VS segundo grupo, independente de tempo, o teste ANOVA indicou diferença estatisticamente significativa nos valores médios de OC ($p < 0,05$), não ocorrendo diferença entre LH e VS ($p > 0,05$) (Tabela II, pág 23).

O teste de correlação de Pearson verificou correlação positiva e muito forte entre OC e LH (0,91301), ou seja, observou-se que à medida que aumentou o número de OC houve também aumento no número de LH (Tabela III, pág 23).

DISCUSSÃO

O LP desempenha papel fundamental para que o processo de movimentação dentária ocorra. Sua compressão induz estímulos geradores de inflamação local, favorecendo o surgimento de um microambiente susceptível à reabsorção óssea.²⁴ Em ratos, 10 a 14 dias são necessários para um completo ciclo da remodelação óssea do LP,²⁵ por isso foi este o tempo de permanência do dispositivo na cavidade bucal nos animais avaliados.

Foi utilizada força contínua de 50cN, baseada nos estudos de Carlos²⁶ e Silveira⁶ para desencadear os eventos relacionados à resposta biológica no LP de ratos. Entretanto, esta força se mostrou exagerada, pois observou-se AH, principalmente nas raízes distais e disto-palatinas, e de RS nos grupos C e E, nos quais foi realizada movimentação dentária. Esta força de alta magnitude não prejudicou a avaliação dos resultados da pesquisa, pois da mesma forma foi possível verificar todos os eventos que caracterizam o movimento dentário induzido.

De acordo com Ren et al,²⁷ as AH observadas em tempos variados de movimentação dentária são compatíveis com a magnitude de força utilizada.

A presença de AH ocorreu do 1º dia ao 7º dia de indução do movimento, concordando com o estudo de Reitan e Kvan,²⁸ em que este evento é observado após 6 horas da aplicação da força em ratos, enquanto em humanos, ocorre após 30 a 40 horas. AH foram verificadas principalmente nas raízes distais. Por este motivo, optou-se por fazer a avaliação das raízes intermediárias vestibulares, nas quais não há tanta dissipação de força como ocorre nas raízes mesiais e distais.²¹

A partir da aplicação da força, nos grupos C e E, foram observadas respostas típicas do processo inflamatório. Estas características estão de acordo com a teoria pressão-tensão, na qual a compressão e a tração do LP estimulam uma seqüência de eventos, que inicia-se com a alteração do fluído local e variação do fluxo sanguíneo no LP, estimulando a liberação de mediadores químicos, os quais iniciam uma cascata de sinais que levam à ativação dos OC e dos osteoblastos (OB), que farão a remodelação do osso alveolar adjacente.²⁹ Entretanto, no grupo E, estes eventos ocorreram antes e de forma mais exacerbada, sugerindo que o HC teve um papel importante na aceleração da reabsorção óssea nos períodos iniciais da movimentação ortodôntica.

Isto pode ser verificado, pelo predomínio de unidades de reabsorção, observado neste grupo, constituídas por numerosos OC ativos nos 2º e 3º dias, com declínio nos períodos subseqüentes, com diferença estatisticamente significativa no 2º dia quando comparado com o grupo C ($p < 0,05$). Estes resultados concordam com os de Ribeiro,³⁰ que relatou maior concentração de OC nos períodos iniciais da movimentação dentária, e intensa atividade de reabsorção óssea em ratos sob administração de HC. Este fato deve-se à intensa atividade metabólica que o HC juntamente com a movimentação ortodôntica induz sobre o tecido ósseo.

O maior número de OC no grupo E devido ao estímulo do HC observado nesta pesquisa, assemelha-se aos resultados de Tresguerres et al,² que verificaram aumento da reabsorção óssea após uma semana de aplicação local de 1,2 mg de HC no tecido periimplantar em coelhos. Observaram em cortes histológicos que as trabéculas ósseas recém-formadas mostravam-se mais densas e irregulares quando comparadas ao grupo controle. Shirazi et al³¹ também relataram haver aumento do

número de OC com conseqüente estímulo à reabsorção óssea, induzidos pelo aumento nos níveis de paratormônio. A regulação do desenvolvimento dos OC é carregada por numerosas substâncias, tais como hormônios, citocinas, fatores de crescimento e constituintes da matriz óssea.³²

O LP do rato é destituído de OC maduros em condições fisiológicas, entretanto, após a aplicação de força eles aparecem em poucos dias no lado de compressão.³³ Nos animais observados, este evento ocorreu no 1^o dia após a indução do movimento dentário, sendo o pico no 2^o dia. Por outro lado, em seres humanos, o LP nas mesmas condições fisiológicas podem exibir OC,³⁴ e aproximadamente dois dias após a aplicação da força, as modificações locais permitirão que os OC e os OB iniciem o processo de remodelação óssea, com aposição no lado onde há tração e reabsorção na face em compressão.³⁵

A reabsorção óssea ocorre pela ação de OC ativos.³⁶ Na presente pesquisa verificou-se que a maioria dos OC presentes estavam ativos, uma vez que houve correlação muito forte entre estes e as LH, nos grupos C e E.

Supõe-se que o HC possa agir diretamente nos OC maduros ou indiretamente sobre os OB.³⁶ A quantificação de células formadoras não foi objetivo do presente estudo, portanto, a neoformação óssea não foi avaliada. Contudo observou-se maior número de VS no grupo E, o que pode sugerir antecipação da neoformação óssea. Neste sentido, Ackert-Bicknell et al³⁷ citam que o HC apresenta efeito bifásico no osso atuando na ativação da reabsorção e posteriormente na neoformação óssea. Entretanto, de acordo com Ribeiro³⁰ o HC usado em dose aguda, durante o período de indução do movimento dentário, ocasionou retardo da formação de colágeno imaturo e de nova formação óssea.

A proliferação vascular é observada no LP de dentes movimentados ortodonticamente, favorecendo os processos regenerativos característicos desta região, sendo um importante mediador para o processo de remodelação óssea.³⁸ No presente trabalho, foi observado aumento no número de VS em ambos os grupos, decorrente da força aplicada. Este aumento foi maior no grupo E, porém sem diferença estatisticamente significativa, mas pode-se observar neste grupo que o HC intensificou a vascularização quando comparada à do grupo C, permanecendo desta forma por mais tempo, até os últimos períodos avaliados. Estes resultados diferem

dos de Ribeiro³⁰ que verificou diminuição no número de VS em ratos sob administração de HC do que naqueles sem o hormônio, porém, a dosagem usada e o tempo de uso do fármaco foram menores do que as utilizadas no presente trabalho. A literatura não mostra a correlação entre o uso do HC e a vascularização, porém, de acordo com Silha et al,³⁹ há evidências de que quando há deficiência ou excesso de HC, a função vascular pode ser modificada.

As características morfológicas teciduais e celulares encontradas no grupo C, sem HC, correspondem a uma típica resposta biológica às forças mecânicas e às reações químicas promovidas pela movimentação dentária ortodôntica sobre o LP, relatados por Macapanpan et al e Heller e Nanda.^{20,40} A comparação do grupo C com o grupo E demonstra que a administração do HC induz a mudanças no LP em dentes de ratos movimentados ortodonticamente.

Todas estas alterações verificadas, devem-se à combinação da força aplicada com a administração do HC, uma vez que o LP dos animais do grupo SA apresentou características de um LP em condições fisiológicas normais. Portanto, o HC por si só, não é capaz de induzir mudanças nestes tecidos, porém o sinergismo entre este hormônio e uma força ortodôntica pode gerar mudanças no LP.

É importante que o ortodontista tenha conhecimento dos fármacos utilizados pelos pacientes, visto que alguns podem influenciar o movimento dentário. Os resultados dessa pesquisa revelaram que o uso do HC em ratos, antes e durante o movimento ortodôntico, pode estimular a reabsorção óssea, verificada pelo maior número de OC no 2º dia do grupo E, retornando aos níveis do grupo C nos dias posteriores. Esta aceleração da reabsorção sugere que possivelmente a neoformação óssea também possa acontecer mais precocemente, entretanto, posteriores estudos poderão ser desenvolvidos. Pode-se sugerir que isto também ocorra em seres humanos, sendo recomendada a aplicação de forças de menor magnitude e o aumento do tempo entre as ativações do aparelho.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que a administração crônica de HC no movimento dentário induzido em ratos *Wistar* antecipou e intensificou a reabsorção óssea.

REFERÊNCIAS

1. Raben MS. Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1958;18:901-903.
2. Tresguerres IF, Alobera MA, Baca R, Tresguerres JAF. Histologic, morphometric, and desitometric study of peri-implant bone in rabbits with local administration of growth hormone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:193-202.
3. Hintz RL. Growth hormone: uses and abuses. *BMJ* 2004;328:907-908.
4. Franco C, Brandberg J, Lonn L, Andersson B, Bengtsson BA, Johannsson G. Growth hormone treatment reduces abdominal visceral fat in postmenopausal women with abdominal obesity: a 12-month placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1466-1474.
5. Melmed S. Supplemental growth hormone in healthy adults: the endocrinologist's responsibility. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006;2:119.
6. Silveira DM, Franco FCM, Nascimento ILO, Salomão MFL, Araujo TM. Pesquisa de interferon gama em tecido periodontal de ratos submetidos à movimentação dentária induzida. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial* 2009;14:39-44.
7. Verna C, Melsen B. Tissue reaction to orthodontic tooth movement in different bone turnover conditions. *Orthod Craniofac Res* 2003;6:155-163.
8. Carvalho S, Souza CM, Neves JC, Pinto SA, Pinto LM, Brito GA, Andrade GM. Effect of venlafaxine on bone loss associated with ligature-induced periodontitis in Wistar rats. *J Negat Results Biomed* 2010;9:3.
9. Liu L, Igarashi K, Haruyama N, Saekis S, Shinoda H, Mitani H. Effects of local administration of clodronate on orthodontic tooth movement and root resorption in rats. *Eur J Orthod* 2004;26:469-473.
10. Mavragani M, Brudvik P, Selvig KA. Orthodontically induced root and alveolar bone resorption: inhibitory effect of systemic doxycycline administration in rats. *Eur J Orthod* 2005;27:215-225.

11. Sandy JR, Harris M. Prostaglandin and tooth movement. *Eur J Orthod* 1984;6:175-82.
12. Rocha JR, Drumond AF, Pretti H, Foresti LS, Andrade RC. Side effects due to orthodontic treatment. *J Bras de Ortod e Ortop Facial* 2001;6.
13. Tyrovola JB, Spyropoulos MN. Effects of drugs and systemic factors on orthodontic treatment. *Quintessence Int* 2001;28:365-371.
14. Ashcraft MB, Southard KA, Tolley EA. The effect of corticosteroid-induced osteoporosis on orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1992;102:310-9.
15. O'Halloran DJ, Tsatsoulis A, Whitehouse RW, Holmes SJ, Adams JE, Shalet SM. Increased bone density after recombinant human growth hormone (GH) therapy in adults with isolated GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1344-8.
16. Tanaka H e Seino Y. Does growth hormone treatment prevent corticosteroid-induced osteoporosis? *Bone* 1996;18:493-4.
17. Nishiyama K, Sugimoto T, Kaji H, Kanatami M, Kodayashi T, Chibara K. Stimulatory effect of growth hormone on bone resorption and osteoclast differentiation. *Endocrinology* 1996;137:35-41.
18. Allen DG, Pringle JK, Smith DA. *Handbook of Veterinary Drugs*. 2nd ed. New York Philadelphia: Lippincott Raven, 1998:842.
19. Bouillon R, Prodonova A. Growth and hormone deficiency and peak bone mass. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13:1327-36.
20. Heller IJ, Nanda R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod* 1979;75:239-258.
21. Fracalossi ACC, Santamaria Jr M, Consolaro MFMO, Consolaro A. Movimentação dentária experimental em murinos: período de observação e plano dos cortes microscópicos. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial* 2009;14:143-157.

22. Arias OR, Marquez-Orozco MC. Aspirin, acetaminophen, and ibuprofen: their effects on orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;130:364-370.
23. Bioestatística: Princípios e aplicações - Sídia Callegari-Jacques. *Artmed* 2003;2:256.
24. Consolaro A. Movimentação dentária induzida: biologia aplicada à prática clínica. In: Consolaro A. *Reabsorções Dentárias nas Especialidades Clínicas*. Maringá: Dental Press 2002:221-57.
25. King GJ, Keeling SD, Wronski TJ. Histomorphometric study of alveolar bone turnover in orthodontic tooth movement. *Bone* 1991;12:401-409.
26. Carlos F, Cobo J, Arguelles J, Costales M, Vijande M. Orthodontic tooth movement after inhibition of cyclooxygenase-2. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129:402-406.
27. Ren Y, Maltha JC, Van't Hof MA, Von Den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM, Zhang D. Cytokine levels in crevicular fluid are less responsive to orthodontic force in adults than in juveniles. *J Clin Periodontol* 2002;29:757-62.
28. Reitan K, Kvan E. Comparative behavior of human and animal tissue during experimental tooth movement. *Angle Orthod* 1971;41:1-14.
29. Proffit WR, Fields HW, Sarver DM. *Contemporary Orthodontics*. 4th ed. St Louis: Mosby Elsevier 2007:309-311.
30. Ribeiro JS. Efeito do hormônio de crescimento no movimento dentário induzido. *Dissertação de Mestrado Ortodontia da PUC-PR* 2008:50.
31. Shirazi M, Khosrowshahi M, Dehpour AR. The effect of chronic renal insufficiency on orthodontic tooth movement in rats. *Angle Orthod* 2001;71:494-8.
32. Ten Cate AR. *Oral histology*. 5th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
33. Noxon SJ, King GJ, Gu G, Huang G. Osteoclast clearance from periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;120:466-476.

34. Avery JK. Oral Development and histology. 3rd ed. Thieme; 2005:242-259.
35. Ferreira FAC. Biomecânica do Movimento Dental. In: Ferreira FV. Ortodontia: Diagnóstico e Planejamento Clínico. 5^a ed. São Paulo: Artes Médicas. 2002:363-398.
36. Russell SM, Spencer EM. Local injections of human or rat growth hormone or of purified human somatomedin-C stimulate unilateral tibial epiphyseal growth in hypophysectomized rats. Endocrinology 1985;116:2563-7.
37. Ackert-Bicknell C, Rubin J, Zhu L, Fran X, Murphy T, Nanes M. IGF-I Acts as a coupling factor for bone remodeling by regulating osteoprotegerin and RANK ligand in vitro and osteoprotegerin in vivo. 84th annual meeting of the endocrine society. San Francisco, CA; 2002:3-366.
38. Toms A, Gannon B, Carati C. The immunohistochemical response of the rat periodontal ligament endothelium to an inflammatory stimulus. Austr Orthod J 2000;16:61-68.
39. Silha JV, Krsek M, Hana V, Marek J, Weiss V, Jezkova J, Rosickat M, Jarkovska Z, Murphy LJ. The effects of growth hormone status on circulating levels of vascular growth factors. Clinical Endocrinology 2005;63:79-86.
40. Macapanpan LC, Weinmann JP, Brodie AG. Early tissue changes following tooth movement in rats. Angle Orthod 1954;24:79-95.

FIGURAS

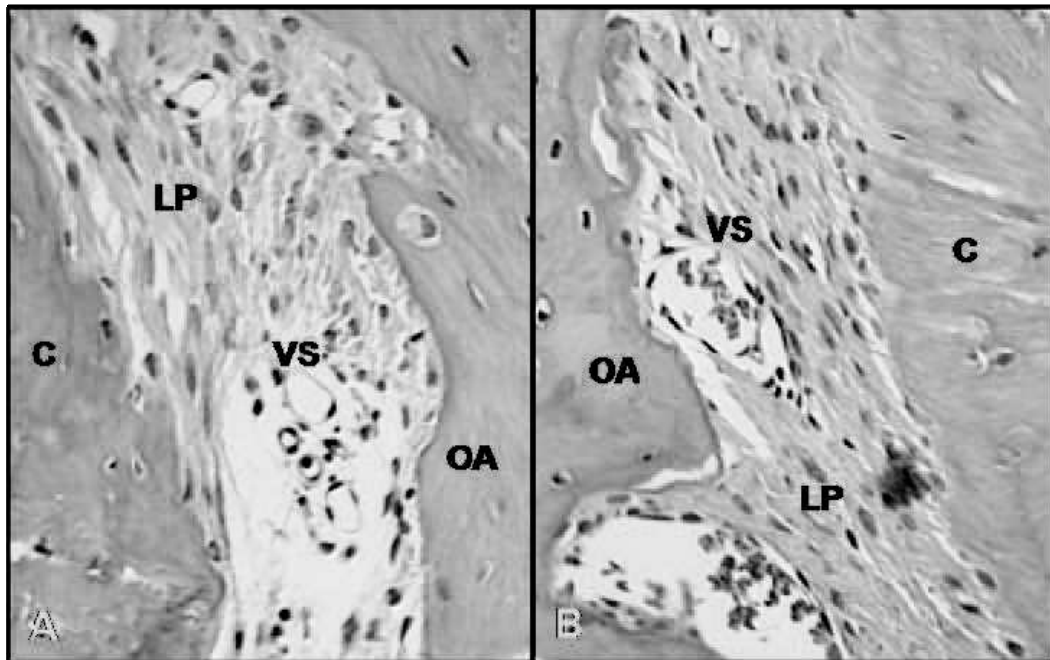


Fig 1. Fotomicrografia do ligamento periodontal do grupo SAIZEN®, com características de normalidade: **A**, face mesial; **B**, face distal; Cimento (C), Osso Alveolar (OA), Ligamento Periodontal (LP) e Vaso Sanguíneo (VS). (H.E. 200x).

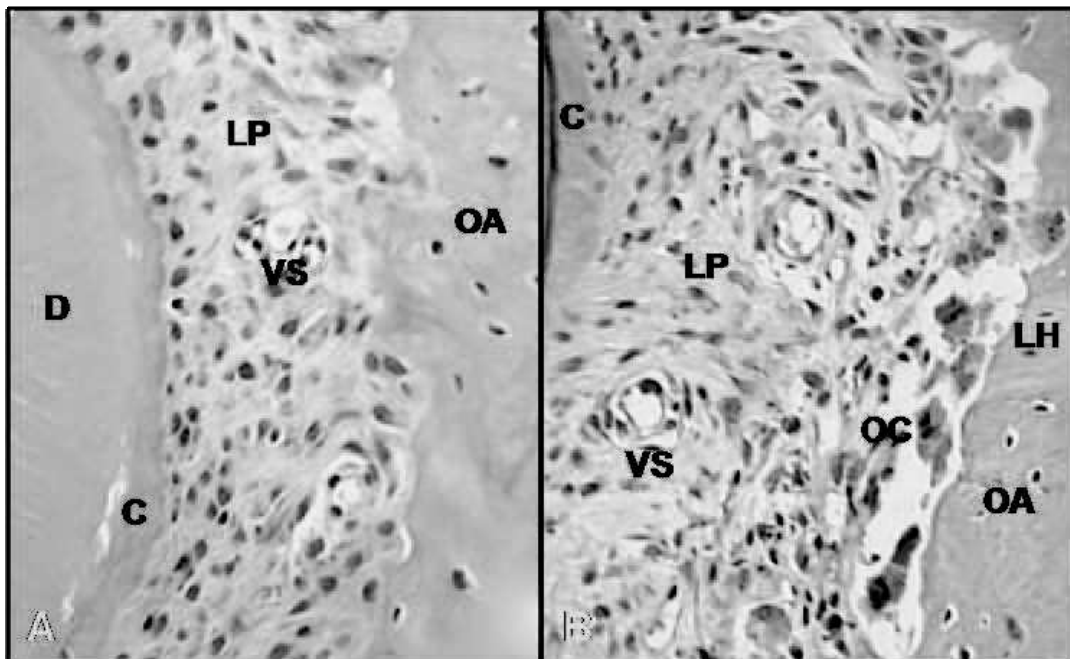


Fig 2. Fotomicrografia da raiz intermediária vestibular no 2º dia: **A**, área de compressão do grupo controle; **B**, área de compressão do grupo experimental, salientando-se maior número de osteoclastos (OC); Cimento (C), Dentina (D), Osso Alveolar (OA), Ligamento Periodontal (LP), Vaso Sanguíneo (VS), Osteoclasto (OC) e Lacunas de *Howship* (LH). (H.E. 200x).

TABELAS

Tabela I. Estatística descritiva de todas as variáveis de acordo com o tempo e teste de Games-Howell de comparações múltiplas intergrupos e no mesmo período de observação

Variável	Dia	Grupo Controle (n=5)			Grupo Experimental (n=5)			Valor p
		Média	Mediana	D.P.	Média	Mediana	D.P.	
Osteoclastos	1	3.60	4.00	1.67	5.20	5.00	1.92	0.93256
	2	5.60	5.00	3.29	15.00	16.00	6.63	0.01012*
	3	9.00	5.00	6.75	10.00	8.00	5.70	1.00000
	5	7.80	8.00	2.28	6.60	6.00	2.19	0.99793
	7	5.00	5.00	2.45	5.60	5.00	2.19	0.99999
	14	2.20	2.00	1.48	2.60	2.00	1.52	0.99999
Lacunas de Howship	1	5.20	5.00	1.92	7.60	8.00	1.14	0.49967
	2	7.60	6.00	4.98	12.20	13.00	5.63	0.94141
	3	12.00	7.00	8.72	12.40	10.00	5.94	1.00000
	5	9.40	10.00	1.95	8.20	7.00	3.35	0.99953
	7	6.00	5.00	1.73	7.00	5.00	3.67	0.99993
	14	2.80	3.00	2.17	3.00	2.00	2.00	1.00000
Vasos Sanguíneos	1	7.00	8.00	1.87	8.00	8.00	1.58	0.99619
	2	7.40	7.00	2.30	8.40	9.00	2.41	0.99973
	3	8.00	8.00	2.24	9.00	9.00	2.24	0.99957
	5	8.60	8.00	2.79	9.00	8.00	2.65	1.00000
	7	8.00	7.00	2.35	9.00	8.00	2.92	0.99990
	14	7.60	7.00	1.52	8.80	8.00	2.77	0.99732

*Valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Tabela II. Estatística descritiva de todas as variáveis de acordo com o grupo e teste de Games-Howell de comparações múltiplas intergrupos

Variável	Grupo Controle (n=30)			Grupo Experimental (n=30)			Valor p
	Média	Mediana	D.P.	Média	Mediana	D.P.	
Osteoclastos	5.53	5.00	3.95	7.50	6.00	5.41	0.04518*
Lacunas de Howship	7.17	6.00	5.01	8.40	7.50	4.91	0.26252
Vasos Sanguíneos	7.77	7.50	2.08	8.70	8.00	2.28	2.37936

*Valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Tabela III. Teste de correlação de Pearson, segundo variáveis analisadas

Variável		Osteoclastos (n=60)	Lacunas de Howship (n=60)	Vasos Sanguíneos (n=60)
Osteoclastos	Correlação de Pearson	1.00000	0.91301	0.18641
	valor p		0.00000*	0.15384*
Lacunas de Howship	Correlação de Pearson	0.91301	1.00000	0.24577
	valor p	0.00000*		0.05838
Vasos Sanguíneos	Correlação de Pearson	0.18641	0.24577	1.00000
	valor p	0.15384*	0.05838*	

*Valores estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

2. ARTIGO EM INGLÊS

TITLE PAGE**The influence of growth hormone on orthodontic tooth movement in rats**

Cristina Hepp,^a Elisa Souza Camargo^b

Graduate Program in Dentistry, Area of concentration in Orthodontics, Catholic University of Paraná (PUCPR)

^aPostgraduate student, Department of Orthodontics

^bAssistant professor, Department of Orthodontics

Corresponding author: Elisa Souza Camargo, Assistant Professor of Undergraduate and Postgraduate Orthodontics, Rua Fernando Simas, 327 / CEP: 80430-190 - Curitiba-PR - Brazil / Phone/Fax: 55 41 33235835 / Res: 55 41 32434907 / e-mail: elisa.camargo@pucpr.br

ABSTRACT

The influence of growth hormone on orthodontic tooth movement in rats

Introduction: Growth hormone (GH) participates in the process of bone remodeling, and its deficiency or excess may interfere with tissue responses originating from orthodontic forces. The aim of the present study was to evaluate histologically the effect of the orthodontic movement on the periodontal ligament under chronic GH use. **Method:** Sixty-five Wistar rats were divided into three groups: SA (Saizen® 0.1 IU/kg/day for 30 days without dental movement), C (control, with tooth movement) and E (experimental, Saizen® 0.1 IU/kg/day for 30 days and until death, with tooth movement). In groups C and E, an orthodontic force (50cN) was applied on an upper right molar, and these rats were sacrificed at 1, 2, 3, 5, 7 and 14 days. Histological sections were stained with hematoxylin and eosin, evaluated by light microscopy, and analyzed qualitatively and quantitatively in the areas of compression and tension of the periodontal ligament. **Results:** Games-Howell verified that Group E had a higher number of osteoclasts on day 2 ($p < 0.05$), and the numbers of Howship's *lacunae* on days 2 and 3 and blood vessels from day 3 on were higher but not significantly different ($p > 0.05$) from Group C. **Conclusion:** The chronic use of growth hormone accelerated and intensified bone resorption during orthodontic movement in rats.

INTRODUCTION

Growth hormone (GH) has undeniable biological effects that intensify anabolic action.¹ Indeed, GH is one of the most important regulatory and remodeling substances of bone growth.²

This hormone has been widely used to treat children with low birth weight (in relation to gestational age) and poor growth until two years of age. Growth hormone has also been used in children with a GH deficiency, adults with deficient or insufficient GH, and adults suffering from weight loss due to AIDS. Although efficacy and safety have not been established, GH is also used in patients with severe catabolic conditions, cystic fibrosis, inflammatory bowel disease, fertility problems, osteoporosis, and Down syndrome.³ In addition, GH is used for the reduction of visceral fat in postmenopausal women.⁴

Growth hormone is also used to reverse the effects of aging and to improve athletic performance, but these uses are considered inappropriate and excessive because there is no evidence showing its effectiveness.⁵ The use of GH to increase the height of children who already have normal heights is also considered abuse.³

Induced tooth movement involves multiple biological processes that are characterized by sequential reactions of the periodontal tissue in response to applied forces. The stimuli generate changes in tissue that, together with the activation of chemical mediators, result in bone remodeling.⁶ These tissue reactions are associated with local factors related to teeth and occlusion as well as systemic factors related to bone metabolism.⁷

Some drugs may affect bone metabolism, including tricyclic antidepressants,⁸ clodronate,⁹ antibiotics,¹⁰ nonsteroidal anti-inflammatory drugs,¹² some hormones¹³ that reduce bone resorption, anti-inflammatory steroids,¹⁴ corticosteroids and other hormones that accelerate bone resorption.

A large body of evidence has demonstrated the important function of GH in maintaining bone mass in adults.¹⁵ Indeed, GH is involved in the process of bone remodeling by stimulating osteoblasts¹⁶ and osteoclasts during apposition and

resorption, respectively.¹⁷ The presence of GH could also affect the behavior of tissue when faced with an orthodontic force.

There are only a few studies in the literature that have examined the use of GH with induced tooth movement. Because many patients receiving orthodontic treatment could be using this hormone as a supplement for aesthetic reasons or to improve athletic performance, we decided to examine the effects of GH on induced tooth movement.

The objective of the present study was to evaluate the effect of GH in the periodontal ligament of rats subjected to induced tooth movement.

MATERIAL AND METHODS

The present study was approved by the Ethics Committee on Animal Use at Catholic University of Paraná (PUCPR) under section nº 428.

We used 65 nine-week-old male Wistar rats (*Rattus norvegicus Albinus*) that weighed approximately 300 to 350 grams and were supplied and maintained in PUCPR's vivarium. The animals were kept in plastic cages with the temperature between 19°C and 22°C and a 12-h light/dark cycle to avoid changes in metabolic cycle. They were provided with water and food pellets *ad libitum*.

Distribution of the Sample (Table 1, p. 30):

The animals were divided into three groups to characterize the evolution of the biological response to induced tooth movement: SA (growth hormone, Saizen®), C (control) and E (experimental):

- The SA group was composed of 5 rats that were chronically administered Saizen® (1.33 mg (4IU) - GH 0.1IU/kg/day) for 30 days. These rats were killed on the 31st day and did not have any induced tooth movement.
- Group C was composed of 30 rats that were killed 1, 2, 3, 5, 7 and 14 days of induced tooth movement with a 50cN force for 30 days.
- Group E was composed of 30 rats that were chronically administered Saizen® (1.33 mg (4IU) - GH 0.1IU/kg/day) after 1, 2, 3, 5, 7 and 14 days of induced tooth movement with a 50cN force for 30 days.

The GH selected was Saizen® 1.33 mg (4IU) (Serono Prods. Farms. Ltda. - Somatropin (r-hGH); Lot Y06A1957, Manufactured: 02/09, Validity: 01/11, registration 1.1124.0184 Laboratoires Serono, Aubonne, Switzerland), and the dosage used was 0.1IU of GH/kg/day.¹⁸ Daily doses of Saizen® were given subcutaneously in the abdominal region at the same time each morning,¹⁹ and we alternated the injections between the right and left side.

Table 1. Distribution of the Sample

Groups	Number of Rats	Induced Tooth Movement	Administration Period of GH - SAIZEN®	Death Day
SAIZEN® (SA)	5	No	31 days	31
Control (C)	30	1 day	No	31
		2 days	No	32
		3 days	No	33
		5 days	No	35
		7 days	No	37
		14 days	No	44
Experimental (E)	30	1 day	31 days	31
		2 days	32 days	32
		3 days	33 days	33
		5 days	35 days	35
		7 days	37 days	37
		14 days	44 days	44

Tooth movement was induced by an orthodontic appliance that consisted of a closed spring of nickel-titanium (3M Unitek®, St. Paul - MN - USA), which was built from the model proposed by Heller and Nanda,²⁰ and a 0.020-inch stainless steel wire (MORELLI® - Dental Morelli Ltda, Sorocaba - SP - Brazil), which was used to fix the spring to the upper right first molar and upper incisors. The spring was positioned to the distal right upper incisor to prevent rotation of the right first molar, which produced a reciprocal force of 50cN (measured by a calibrated device).

To install the orthodontic appliance, the rats were sedated with tiletamine/zolazepam (50 Zoletil®, Brazil Industria e Comercio Ltda, Jurubatuba - SP - Brazil) at a dose of 50 mg/kg body weight and an average volume of 0.25 mL/animal. The anesthetic was injected intramuscularly.

The animals were killed with an intraperitoneal overdose of anesthetic solution (Ketamine 5.4 mL/kg). After dissection and removal of the upper right hemiarch, the specimens were fixed in 10% buffered formalin for 72 hours and demineralized in 4.13% EDTA solution for approximately 12 weeks. After demineralization, we obtained 5-µm-thick cross sections at the cervical third of the first molar.

The histological sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) using the Lison and Harris method. This allowed us to conduct a qualitative analysis to verify the arrangement of collagen fibers (CF), the morphology of fibroblasts (FB), the

presence of overlapping resorption (OR) in the intermediate vestibular root of the periodontal ligament (PL), and to determine whether there were areas of hyalinization (AH) in all the roots of the first molar. The histological sections also permitted us to conduct quantitative analyses of osteoclasts (OC), Howship's *lacunae* (HL), and blood vessels (BV) present throughout the PL of the intermediate vestibular root. The first molar of the rat can produce four to six roots. There are usually five, which are named mesiobuccal, mesiolingual, mesial, distobuccal and distolingual.²¹ We evaluated the compression and tension areas of the intermediate buccal root, that were the mesial and distal sides, respectively.

The slides were examined using light microscopy (Olympus, BX 40) with 400x magnification. The histological criterion used to identify osteoclastic cells was the presence of eosinophilic and multinucleated cells adjacent to the surface of alveolar bone.²² The analyses were performed by a single operator who was blinded to the experimental groups.

For statistical analysis, we used analysis of variance ANOVA followed by the Games-Howell multiple comparison test for heterogeneous variances. To determine whether there was a correlation between OC, HL, and BV variables, we used the Pearson correlation coefficient.²³

RESULTS

QUALITATIVE ANALYSIS

- **Saizen® Group (SA - GH rats without tooth movement)**

The slides of the SA group showed a predominance of spindle FB and organized CF bundles, which were stretched and parallel on both the mesial and

distal sides. Although there were numerous BV, the presence of OC and HL was scarce (Fig 1, A and B; p. 43). There was no AH or OR.

- **Control group (C - tooth movement without GH)**

In the first two days, the PL in the compression area had a predominance of ovoid FB, bundles of disorganized CF and compression of BV. We observed a small amount of OC within the HL that were contiguous with the bone surface and showed little vascularization (Fig 4, A and E; p. 56). In the area of tension, the PL had a predominance of spindle FB, stretched CF bundles (oblique and parallel to each other) and dilated BV (Fig 4, C and G; p. 56).

The effects in the area of compression intensified in the third and fifth days, and there was an increase in disorganization of the CF (Fig 4, I and 5, A; p. 56 and 57). In addition, there were increases in the amounts of OC within the HL and the amount of BV (Fig 4, I and 5, A; p. 56 and 57).

After the initial phase of tooth movement, there was a decrease in the amount of OC, HL, and BV from day 7 to day 14 (Fig 5, E, G, R and K; p. 57). On the 14th day, the CF bundles on the tension side stayed organized (Fig 5, K; p. 57), whereas those on the compression side remained disorganized (Fig 5, I; p. 57). The disorganization, however, was not as extreme as earlier time points, and the PL tended to be normal.

- **Experimental group (E - tooth movement with GH)**

On the first and second days, areas of compression and tension showed a moderate amount of BV (Fig 4, B, D, F and H; p. 56). In the area of compression, we observed a predominance of ovoid FB and disorganized bundles of CF, whereas the tension area was permeated by spindle FB. Moreover, the bundles were stretched, oblique and parallel to each other (Fig 4, B; p. 56).

On day 2, the PL of the rats in Group E exhibited numerous contiguous superficial alveolar bone OC, more than in group C (Fig 2, A and B; p. 43) with intense resorptive activity (Fig 4, F and H; p. 56). In addition, the number of BV increased on day 3 (Fig 4, J and L; p. 56).

On days 5, 7, and 14 there was a gradual decrease in the number of OC and the HL (Fig 5, B, D, F, H, J and L; p. 57). Although the number of BV remained constant until the 7th day, they showed a small decrease on day 14.

The shape of the FB and the arrangement of the CF remained similar to the previous days. On day 14, the CF on the tension side stayed organized (Fig 5, D, H and L; p. 57), whereas the compression side was disorganized. The intensity, however, was less than previous times (Fig 5, B, F and J; p. 57), and the PL tended to be normal.

OR was present in groups C and E at every time point in the study (Fig 6, A; p. 58), and AH was primarily present in the distopalatal and distobuccal roots in groups C and E from the first to the seventh days (Fig 6, B; p. 58). The presence of cementoclasts was not observed in any of the groups.

QUANTITATIVE ANALYSIS

The results of quantitative analysis, including the averages, the standard deviations, and the p values, are described in Table I (p. 44).

On the 1st, 3rd, 5th, 7th, and 14th days after starting tooth movement, the Games-Howell test for multiple comparisons did not identify a statistically significant difference between groups C and E in relation to OC, HL, and BV (Table I, p. 44).

On the second day, we noticed a statistically significant difference between groups C (5.6 ± 3.29) and E (15 ± 6.63) ($p < 0.05$) with respect to OC. In relation to HL

and BV, we did not find any statistically significant differences between groups C and E (Table I, p. 44).

Although ANOVA of the average values of OC, HL and BV in the second group, regardless of time, indicated statistically significant differences in average OC values ($p < 0.05$), there were no differences between HL and BV ($p > 0.05$) (Table II, p. 45).

The Pearson correlation test showed a very strong positive correlation between OC and HL (0.91301). Indeed, increases in the number of OC correlated with an increase in the number of HL (Table III, p. 45).

DISCUSSION

The PL has a fundamental role in the process of tooth movement. Its compression induces stimuli generated by local inflammation, which helps to create a microenvironment capable of bone resorption.²⁴ In rats, 10 to 14 days are required to complete a cycle of bone remodeling in the PL,²⁵ which is why this was the length of time that the device was used in the oral cavity of the rats in the present study.

Following studies by Carlos²⁶ and Silveira,⁶ a continuous force of 50cN was used to trigger the events related to a biological response in the PL of rats. This strength was exaggerated, however, because AH was primarily observed in distal and disto-palatal roots and OR in groups C and E, which had tooth movement. The high magnitude force did not impair the evaluation of the results because it was possible to check all the events that characterize tooth movement. In agreement with Ren et al.,²⁷ the AH observed at varying times of tooth movement were consistent with the magnitude of force used.

The presence of AH occurred from the first to the seventh day of induced movement. This finding was in agreement with the study by Reitan and Kvan,²⁸ who observed the presence of AH after 6 hours of applied force in rats. Interestingly, the presence of AH in humans occurs after 30 to 40 hours of applied force. Because AH

were mainly observed in distal roots, we chose to assess the intermediate vestibular roots where there is not as much dissipation of force as in the mesial and distal roots.²¹

We observed typical inflammatory processes in response to the applied force in groups C and E. These characteristics were consistent with the pressure-tension theory in which the compression and tension of the PL stimulates a sequence of events that starts with the changing of the local fluid and variation in blood flow in the PL. This stimulates the release of chemical mediators, which starts a cascade of signals that leads to the activation of OC and osteoblasts (OB), which remodel the adjacent alveolar bone.²⁹ In group E, however, these events occurred earlier and were more extreme than they were in group C, which suggested that the GH had an important role in accelerating bone resorption in the initial stages of orthodontic movement.

The role of GH in accelerating bone resorption can be verified by the predominance of units of resorption observed in group E. Group E consisted of numerous active OC on the second and third days, which declined in subsequent periods. Compared with group C, group E showed a significant difference in active OC on the third day ($p < 0.05$). These results agree with those of Ribeiro³⁰ who reported a greater concentration of OC in the early periods of tooth movement and intense bone resorption in rats administered GH. The increase in OC is due to the intense metabolic activity caused by GH and orthodontic movement in bone tissue.

The larger number of OC in group E was due to the stimulation by GH, which is similar to the results of Tresguerres et al.² who found increased bone resorption after a week of local application of 1.2 mg GH in peri-implant tissue in rabbits. They observed that histological sections of newly formed bone trabeculae from rabbits that received GH were more dense and irregular than the control group. Shirazi et al.¹ also reported that there was an increased number of OC with GH stimulation following bone resorption induced by increased levels of parathyroid hormone. Osteoclast development is regulated by numerous substances, such as hormones, cytokines, growth factors, and bone matrix constituents.³²

The PL of the rat is devoid of mature OC under physiological conditions; however, after the application of force, they appear on the side of compression within

a few days.³³ In the present study, this event occurred on the first day after starting tooth movement and peaked on day two. Under the same physiological conditions, the PL in humans may exhibit OC.³⁴ Approximately two days after the application of force, local modifications will allow the OC and OB to begin the process of bone remodeling with apposition on the tension side and absorption on the compression side.³⁵

Bone resorption occurs through the action of active OC.³⁶ In the present study, we found that the majority of OC were active because there was a strong correlation between OC and HL in groups C and E.

Growth hormone is believed to act directly on mature OC and indirectly on OB.³⁶ Quantification of formed cells was not the objective of this study; therefore, new bone formation was not evaluated. Interestingly, there was a higher number of BV in Group E, which may suggest anticipation of new bone formation. Indeed, Ackert-Bicknell et al.³⁷ reported that GH has a biphasic effect on bone activating resorption and subsequent bone regeneration. According to Ribeiro,³⁰ however, acute administration of GH during the initial period of tooth movement caused a delay in the formation of immature collagen and new bone.

Vascular proliferation was observed in the PL of orthodontically moved teeth, which promoted regenerative processes characteristic of this region. Indeed, vascular proliferation is an important mediator in bone remodeling.³⁸ In the present study, we observed an increase in the number of BV in groups C and E, which stemmed from the applied force. This increase was greater in group E, but the difference was not statistically significant. Interestingly, GH intensified vascularization in group E compared with group C, and vascularization remained more intense until the last periods evaluated. These results differ from those found by Ribeiro,³⁰ which showed a decrease in the number of BV in rats receiving GH compared with rats without GH. In the Ribeiro³⁰ study, the dose of GH and the number of days that the hormone was administered were lower than those used in the present study. In addition, the literature does not show a correlation between the use of GH and vascularization. In agreement with Silha et al.,³⁹ however, there is evidence that vascular function may be modified when there is deficiency or excess of GH.

The tissue and cellular morphology detected in group C (without GH) corresponded to a typical biological response in the PL to mechanical forces and chemical reactions caused by orthodontic tooth movement, which was similar to the results of Macapanpan et al. and Heller and Nanda.^{20,40} A comparison of groups C and E showed that the administration of GH causes changes in the PL in orthodontically moved teeth in rats.

All the changes observed in the experimental group were due to the combination of the force applied to the tooth and the administration of GH because the PL of the animals in group SA showed characteristics of a PL in a normal physiological condition. Therefore, the GH by itself is not able to induce changes in these tissues, but the synergism between this hormone and an orthodontic force can generate changes in the PL.

It is important that the orthodontist is aware of the drugs used by patients because some may influence tooth movement. The results of the present study reveal that the use of GH in rats before and during orthodontic movement can stimulate bone resorption, which was verified by a larger number of OC on day two in group E (the levels returned to control levels in the subsequent days). This acceleration of resorption suggests that new bone formation could occur earlier. Subsequent studies can expand upon this research. Researchers have also suggested that the effects observed in the present study occur in humans. The current recommendation is that the applied forces should be of a lesser magnitude, and the time between activations of the orthodontics appliance should be increased.

CONCLUSION

Based on the results of the present study, we conclude that chronic administration of GH in tooth movement in Wistar rats accelerated and intensified bone resorption.

REFERENCES

1. Raben MS. Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1958;18:901-903.
2. Tresguerres IF, Alobera MA, Baca R, Tresguerres JAF. Histologic, morphometric, and desitometric study of peri-implant bone in rabbits with local administration of growth hormone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:193-202.
3. Hintz RL. Growth hormone: uses and abuses. *BMJ* 2004;328:907-908.
4. Franco C, Brandberg J, Lonn L, Andersson B, Bengtsson BA, Johannsson G. Growth hormone treatment reduces abdominal visceral fat in postmenopausal women with abdominal obesity: a 12-month placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1466-1474.
5. Melmed S. Supplemental growth hormone in healthy adults: the endocrinologist's responsibility. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006;2:119.
6. Silveira DM, Franco FCM, Nascimento ILO, Salomão MFL, Araujo TM. Gamma-interferon investigation in rat periodontal tissue under induced dental movement. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial* 2009;14:39-44.
7. Verna C, Melsen B. Tissue reaction to orthodontic tooth movement in different bone turnover conditions. *Orthod Craniofac Res* 2003;6:155-163.
8. Carvalho S, Souza CM, Neves JC, Pinto SA, Pinto LM, Brito GA, Andrade GM. Effect of venlafaxine on bone loss associated with ligature-induced periodontitis in Wistar rats. *J Negat Results Biomed* 2010;9:3.
9. Liu L, Igarashi K, Haruyama N, Saekis S, Shinoda H, Mitani H. Effects of local administration of clodronate on orthodontic tooth movement and root resorption in rats. *Eur J Orthod* 2004;26:469-473.
10. Mavragani M, Brudvik P, Selvig KA. Orthodontically induced root and alveolar bone resorption: inhibitory effect of systemic doxycycline administration in rats. *Eur J Orthod* 2005;27:215-225.

11. Sandy JR, Harris M. Prostaglandin and tooth movement. *Eur J Orthod* 1984;6:175-82.
12. Rocha JR, Drumond AF, Pretti H, Foresti LS, Andrade RC. Side effects due to orthodontic treatment. *J Bras de Ortod e Ortop Facial* 2001;6.
13. Tyrovola JB, Spyropoulos MN. Effects of drugs and systemic factors on orthodontic treatment. *Quintessence Int* 2001;28:365-371.
14. Ashcraft MB, Southard KA, Tolley EA. The effect of corticosteroid-induced osteoporosis on orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1992;102:310-9.
15. O'Halloran DJ, Tsatsoulis A, Whitehouse RW, Holmes SJ, Adams JE, Shalet SM. Increased bone density after recombinant human growth hormone (GH) therapy in adults with isolated GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1344-8.
16. Tanaka H e Seino Y. Does growth hormone treatment prevent corticosteroid-induced osteoporosis? *Bone* 1996;18:493-4.
17. Nishiyama K, Sugimoto T, Kaji H, Kanatami M, Kodayashi T, Chibara K. Stimulatory effect of growth hormone on bone resorption and osteoclast differentiation. *Endocrinology* 1996;137:35-41.
18. Allen DG, Pringle JK, Smith DA. *Handbook of Veterinary Drugs*. 2nd ed. New York Philadelphia: Lippincott Raven, 1998:842.
19. Bouillon R, Prodonova A. Growth and hormone deficiency and peak bone mass. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13:1327-36.
20. Heller IJ, Nanda R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod* 1979;75:239-258.
21. Fracalossi ACC, Santamaria Jr M, Consolaro MFMO, Consolaro A. Experimental tooth movement in murines: study period and direction of microscopic sections. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial* 2009;14:143-157.

22. Arias OR, Marquez-Orozco MC. Aspirin, acetaminophen, and ibuprofen: their effects on orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;130:364-370.
23. Biostatistics: Principles and applications - Sídia Callegari-Jacques. *Artmed* 2003;2:256.
24. Consolaro A. Induced tooth movement: biology applied to clinical practice. In: Consolaro A. *Resorption in Dental Specialties Clinics*. Maringá: Dental Press 2002:221-57.
25. King GJ, Keeling SD, Wronski TJ. Histomorphometric study of alveolar bone turnover in orthodontic tooth movement. *Bone* 1991;12:401-409.
26. Carlos F, Cobo J, Arguelles J, Costales M, Vijande M. Orthodontic tooth movement after inhibition of cyclooxygenase-2. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129:402-406.
27. Ren Y, Maltha JC, Van't Hof MA, Von Den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM, Zhang D. Cytokine levels in crevicular fluid are less responsive to orthodontic force in adults than in juveniles. *J Clin Periodontol* 2002;29:757-62.
28. Reitan K, Kvan E. Comparative behavior of human and animal tissue during experimental tooth movement. *Angle Orthod* 1971;41:1-14.
29. Proffit WR, Fields HW, Sarver DM. *Contemporary Orthodontics*. 4th ed. St Louis: Mosby Elsevier 2007:309-311.
30. Ribeiro JS. Effect of growth hormone in experimental tooth movement. *Orthodontics Master's Dissertation - PUC-PR* 2008:50.
31. Shirazi M, Khosrowshahi M, Dehpour AR. The effect of chronic renal insufficiency on orthodontic tooth movement in rats. *Angle Orthod* 2001;71:494-8.
32. Ten Cate AR. *Oral histology*. 5th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
33. Noxon SJ, King GJ, Gu G, Huang G. Osteoclast clearance from periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;120:466-476.

34. Avery JK. Oral Development and histology. 3rd ed. Thieme; 2005:242-259.
35. Ferreira FAC. Dental Biomechanics of Movement. In: Ferreira FV. Orthodontics: Clinical Diagnosis and Planning. 5th ed. São Paulo: Medical Arts. 2002:363-398.
36. Russell SM, Spencer EM. Local injections of human or rat growth hormone or of purified human somatomedin-C stimulate unilateral tibial epiphyseal growth in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 1985;116:2563-7.
37. Ackert-Bicknell C, Rubin J, Zhu L, Fran X, Murphy T, Nanes M. IGF-I Acts as a coupling factor for bone remodeling by regulating osteoprotegerin and RANK ligand in vitro and osteoprotegerin in vivo. 84th annual meeting of the endocrine society. San Francisco, CA; 2002:3-366.
38. Toms A, Gannon B, Carati C. The immunohistochemical response of the rat periodontal ligament endothelium to an inflammatory stimulus. *Austr Orthod J* 2000;16:61-68.
39. Silha JV, Krsek M, Hana V, Marek J, Weiss V, Jezkova J, Rosickat M, Jarkovska Z, Murphy LJ. The effects of growth hormone status on circulating levels of vascular growth factors. *Clinical Endocrinology* 2005;63:79-86.
40. Macapanpan LC, Weinmann JP, Brodie AG. Early tissue changes following tooth movement in rats. *Angle Orthod* 1954;24:79-95.

FIGURES

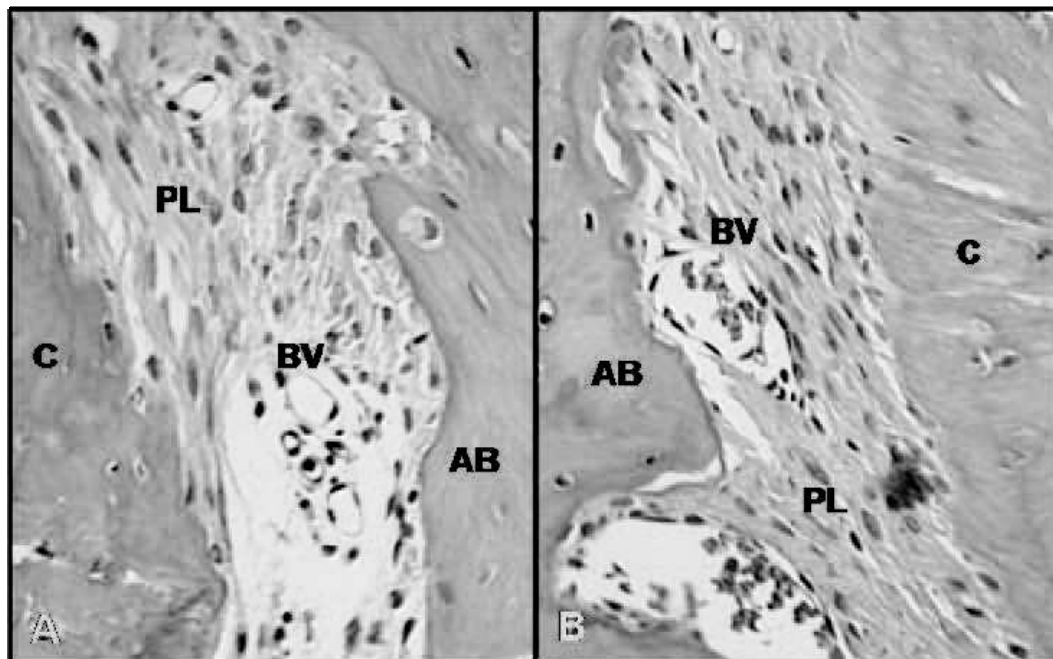


Fig 1. Photomicrograph of periodontal ligament from a rat in the Saizen[®] group with normal characteristics: **A**, mesial surface; **B**, distal surface. Cement (C), Alveolar Bone (AB), Periodontal Ligament (PL) and Blood Vessel (BV). (H.E. Magnification 200x).

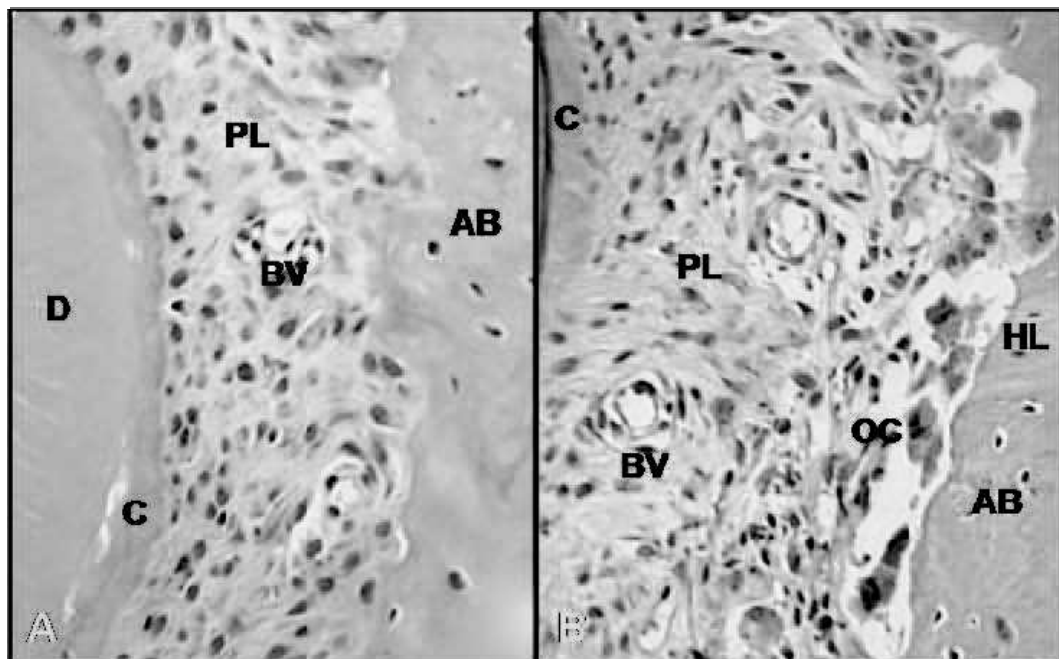


Fig 2. Photomicrograph of the intermediate vestibular root on day 2: **A**, the compression area of the control group; **B**, the compression area of the experimental group, which emphasizes the greater number of osteoclasts (OC). Cement (C), Dentine (D), Alveolar Bone (AB), Periodontal Ligament (PL), Blood Vessel (BV), Osteoclast (OC) and Howship Lacunae (HL). (H.E. Magnification 200x).

TABLES

Table I. Descriptive statistics of variables according with the moment and Games-Howell test with multiple comparisons intergroups and equal observations periods

Variable	Day	Control Group (n=5)			Experimental Group (n=5)			p value
		Mean	Median	S.D.	Mean	Median	S.D.	
Osteoclasts	1	3.60	4.00	1.67	5.20	5.00	1.92	0.93256
	2	5.60	5.00	3.29	15.00	16.00	6.63	0.01012*
	3	9.00	5.00	6.75	10.00	8.00	5.70	1.00000
	5	7.80	8.00	2.28	6.60	6.00	2.19	0.99793
	7	5.00	5.00	2.45	5.60	5.00	2.19	0.99999
	14	2.20	2.00	1.48	2.60	2.00	1.52	0.99999
Howship Lacunae	1	5.20	5.00	1.92	7.60	8.00	1.14	0.49967
	2	7.60	6.00	4.98	12.20	13.00	5.63	0.94141
	3	12.00	7.00	8.72	12.40	10.00	5.94	1.00000
	5	9.40	10.00	1.95	8.20	7.00	3.35	0.99953
	7	6.00	5.00	1.73	7.00	5.00	3.67	0.99993
	14	2.80	3.00	2.17	3.00	2.00	2.00	1.00000
Blood Vessels	1	7.00	8.00	1.87	8.00	8.00	1.58	0.99619
	2	7.40	7.00	2.30	8.40	9.00	2.41	0.99973
	3	8.00	8.00	2.24	9.00	9.00	2.24	0.99957
	5	8.60	8.00	2.79	9.00	8.00	2.65	1.00000
	7	8.00	7.00	2.35	9.00	8.00	2.92	0.99990
	14	7.60	7.00	1.52	8.80	8.00	2.77	0.99732

* Values statistically significant ($p < 0,05$).

Table II. Descriptive statistics of variables according with the group and Games-Howell test with multiple comparisons intergroups

Variable	Control Group (n=30)			Experimental Group (n=30)			p value
	Mean	Median	S.D.	Mean	Median	S.D.	
Osteoclasts	5.53	5.00	3.95	7.50	6.00	5.41	0.04518*
Howship Lacunae	7.17	6.00	5.01	8.40	7.50	4.91	0.26252
Blood Vessels	7.77	7.50	2.08	8.70	8.00	2.28	2.37936

* Values statistically significant ($p < 0,05$).

Table III. Pearson correlation test, according to variables

Variable		Osteoclasts (n=60)	Howship Lacunae (n=60)	Blood Vessels (n=60)
Osteoclasts	Pearson Correlation	1.00000	0.91301	0.18641
	p value		0.00000*	0.15384*
Howship Lacunae	Pearson Correlation	0.91301	1.00000	0.24577
	p value	0.00000*		0.05838
Blood Vessels	Pearson Correlation	0.18641	0.24577	1.00000
	p value	0.15384*	0.05838*	

* Values statistically significant ($p < 0,05$).

3. ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
NÚCLEO DE BIOÉTICA
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Curitiba, 10 de junho de 2010

REGISTRO DO PROJETO NO CEUA: 428 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO:

Efeito do hormônio de crescimento na movimentação ortodôntica em ratos

PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Elisa Souza Camargo

EQUIPE DA PESQUISA:

Elisa Souza Camargo, Cristina Hepp, Denise Odete Manarelli

INSTITUIÇÃO:

PUCPR

CATEGORIA DO EXPERIMENTO – CATEGORIA C

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE E/OU PESO	QUANTIDADE
<i>Rattus norvegicus albinus</i>	Macho	3 meses, 300 a 350g	65

O colegiado do CEUA em reunião no dia 10/06/2010, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando 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 senhor pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,


Prof.ª Gracinda Maria D'Almeida e Oliveira
Coordenadora
Comitê de Ética no Uso de Animais - PUCPR



ANEXO 2 – MÉTODO

O presente estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) sob registro nº 241, tendo sido aprovado, parecer nº 428.

Seleção da Amostra

A amostra foi constituída por 65 ratos machos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*) com 9 semanas de vida, pesando aproximadamente entre 300 e 350g, provenientes do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).

O método experimental e todos os experimentos realizados obedeceram às recomendações éticas, legais e de biossegurança especificadas para a experimentação animal (Rowsell, 1986¹). Animais machos foram usados para eliminar qualquer variabilidade hormonal devido ao ciclo reprodutivo da fêmea. O período de aclimação não foi necessário devido ao nascimento e ao experimento serem realizados no mesmo ambiente (Biotério PUCPR).

¹ Rowsell, H.C. (1986) *Acta Physiol Scand Suppl*, 554, 95-105.

Acondicionamento da Amostra

Durante o período experimental os animais permaneceram no Biotério da PUCPR e foram acondicionados em gaiolas contendo 5 animais em cada. A gaiola-viveiro foi constituída de caixas de propileno semi-fosco com locais específicos para colocação de alimento e água. Durante todo o experimento, as gaiolas permaneceram forradas com cepilho (*maravalha de pinus*), com a finalidade de absorver a urina dos animais e a água derramada no seu interior, manter o fundo sempre seco, e servir de isolante térmico, a fim de reduzir a condução de calor do corpo dos animais.

As raspas de madeira foram substituídas diariamente para evitar o acúmulo de gases tóxicos (amônia e sulfeto de hidrogênio) resultantes da degradação oxidativa e bacteriana dos excrementos, oferecendo assim, condições favoráveis de higiene, conforto e bem-estar (Baker, Lindsey e Weisbroth, 1979²).

Foram utilizados dispensadores de vidro para água, com bico de aço inoxidável, com capacidade para 500mL, disponíveis permanentemente na gaiola para garantir suprimento constante de água mineral aos animais.

Para diminuir a possibilidade de danificação ou remoção do acessório ortodôntico que será posteriormente descrito, inicialmente a ração comercial (Labina - Purina) foi picada aos poucos até que os animais se acostumassem a comê-la triturada. Esta ração foi amolecida com água e fornecida aos animais *ad libitum* e trocada diariamente para evitar a formação e proliferação de fungos por exposição prolongada do alimento. Os ratos permaneceram em local com iluminação natural e temperatura ambiente, apresentando-se limpo e arejado. O uso de substâncias desodorizantes ou desinfetantes foi evitado para não causar qualquer interferência no experimento (Baker, Lindsey e Weisbroth, 1979²).

² Baker, D.E.J.; Lindsey, J.R.; Weisbroth, S.H. (1979) *The Laboratory Rat*, Academic Press, New York, p.169-192.

Foi realizado controle de fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro para evitar alterações no ciclo metabólico (Yamauchi *et al.*, 1981³). Cada animal recebeu uma identificação para atender os objetivos dos autores. Com o objetivo de observar alterações de peso e para o cálculo e ajustes das dosagens da medicação que foi administrada, os animais foram pesados no início da pesquisa e diariamente, até sua conclusão com auxílio de balança eletrônica de precisão (Gehaka – BG 4001).

Administração da Droga

O fármaco utilizado foi SAIZEN[®] 1,33 mg (4UI) - Serono Prods. Farms. Ltda. – Somatropina (r-hGH) - (Lote Y06A1957, Fabricação: 02/09, Validade: 01/11, Registro 1.1124.0184, Laboratoires Serono, Aubonne, Suisse).

Foram realizadas aplicações diárias de 0,1UI de HC/kg/dia (Bouillon; Prodonova, 2000⁴; Mac Gillivray *et al.*, 1998⁵), via subcutânea na região abdominal alternando entre o lado direito e o esquerdo, iniciando 30 dias antes da instalação do acessório ortodôntico e prosseguindo com uso contínuo até o final do experimento, sempre no mesmo horário (Fig 3, A; pág 53). A administração do medicamento foi realizada de forma cautelosa para que não causasse nenhum tipo de dor ou sofrimento aos animais.

Distribuição da Amostra

Os animais foram distribuídos em três grupos, o grupo SA (hormônio de crescimento, SAIZEN[®]), o C (controle) e o E (experimental), com a finalidade de caracterizar a evolução do movimento dentário induzido ao longo do tempo. O grupo de dentes estudado foi composto pelos primeiros molares superiores do lado direito.

³ Yamauchi, C.; Fujita, S.; Obara, T.; Ueda T. (1981) *Lab. Anim. Sci.*, **31**(3),251-8.

⁴ Bouillon, R.; Prodonova, A. (2000) *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **13**(Suppl 6),1327-36.

⁵ Mac Gillivray, M.H.; Blethen, S.L.; Buchlis, J.G. *et al.* (1998) *Pediatrics*, **102**(2), 527-530.

- O grupo SA composto por 05 animais, mortos no 31^o dia após administração do hormônio de crescimento SAIZEN® 1,33 mg (4UI) - 0,1UI de HC/kg/dia durante 30 dias, sem movimento dentário induzido.
- O grupo C continha 30 animais, mortos após 1, 2, 3, 5, 7 e 14 dias após o movimento dentário induzido, submetidos à força ortodôntica de 50cN, sem o uso de nenhuma droga.
- O grupo E continha 30 animais, mortos após 1, 2, 3, 5, 7 e 14 dias de movimento dentário induzido submetidos à força ortodôntica de 50cN, sob administração de SAIZEN® 1,33 mg (4UI) - 0,1UI de HC/kg/dia durante 30 dias antes do início do movimento dentário e até o dia da sua morte.

Preparo do Acessório Ortodôntico

O acessório ortodôntico construído a partir do modelo proposto por Heller e Nanda (1979)⁶ consistiu de em uma mola de níquel-titânio fechada (3M Unitek®, St. Paul - MN - USA) e fio de amarrilho de aço inoxidável com 0,020 polegadas (MORELLI® - Dental Morelli Ltda, Sorocaba - SP - Brasil), para fixação da mola no primeiro molar direito e nos incisivos superiores.

Anestesia dos Animais para Instalação do Dispositivo Ortodôntico

Para o procedimento de instalação do dispositivo ortodôntico os animais foram sedados com Tiletamina/Zolazepam (Zoletil 50®, Brasil Indústria e Comércio Ltda, Jurubatuba - SP - Brasil, Virbac), na dosagem de 50mg/kg de peso corporal e média de volume de 0,25 ml/animal. Esta substância foi injetada no músculo quadríceps do membro inferior esquerdo.

⁶ Heller, I.J.; Nanda, R. (1979) *Am. J. Orthod.* **75**(3), 239-258.

Instalação e Ativação dos Dispositivos Ortodônticos

Após posicionar os animais em mesa operatória própria para contenção e abertura da boca dos animais, foi instalada uma mola espiralada ortodôntica fechada (3M Unitek - Indústria e Comércio Ltda, Brasil) que produziu uma força no sentido distal dos incisivos superiores e mesial no molar superior direito. Para fixar esta mola ao primeiro molar, amarrilho de aço de 0,020 polegadas foi dobrado de maneira a adquirir a forma de anzol. Este foi inserido inicialmente por vestibular e pelo espaço interproximal entre os primeiros e segundos molares superiores direitos, prendendo uma extremidade da mola (Fig 3, B; pág 53). Uma vez apreendida a ponta do fio por palatino do espaço interproximal com porta agulha *Mathieu*, a mola foi fixada amarrando-a de forma que ficou posicionada por mesial e o mais próximo possível da coroa do primeiro molar. O fio de amarrilho fez analogia a uma banda circundando a coroa do primeiro molar (Fig 3, C; pág 53) e ao mesmo tempo fixando uma das extremidades da mola (Fig 3, C, pág 53).

A outra extremidade foi unida aos incisivos superiores, por meio de fio de amarrilho 0,020 polegada e resina composta (Fig 3, C e F; pág 53).

Para tanto, o esmalte foi condicionado com ácido fosfórico a 37% por 10 segundos (Fig 3, D; pág 53), em seguida a superfície foi lavada com água por 15 segundos e seca. O agente de união foi aplicado sobre a superfície condicionada do esmalte e fotopolimerizado com luz halógena por 20 segundos com auxílio do aparelho de fotopolimerização previamente calibrado (Fig 3, E; pág 53). Uma força inicial de 50cN foi aplicada. Para a fixação do fio de amarrilho e conseqüentemente da mola, foi acrescentada uma camada de resina composta micro-híbrida (CHARISMA® - Heraeus Kulzer) (Fig 3, F; pág 53). A incisal dos incisivos inferiores foi desgastada para dificultar a quebra do dispositivo (Fig 3, G; pág 53). Após a ativação inicial, o dispositivo não foi reativado durante o período experimental, no entanto seu posicionamento foi conferido diariamente. Os animais que morreram antes do término do experimento ou nos quais houve perda da mola, foram excluídos da amostra e substituídos por outros animais para ser feito o experimento.

Morte dos animais, Obtenção e Preparo dos Espécimes

Os animais foram mortos por dose excessiva de solução anestésica (Quetamina 5,4ml/kg), via intraperitoneal.

Após constatada a morte dos animais, suas cabeças foram dissecadas removendo os componentes de tecido mole com auxílio de lâmina de bisturi. As maxilas foram separadas dos crânios e as áreas de interesse imersas em solução de formalina 10% tamponada para fixação, por período de 72 horas. Observou-se diastema entre os molares onde foi aplicada a força (Fig 3, H*; pág 53), comparado ao lado oposto (Fig 3, H**; pág 53). Após, os espécimes foram colocados em solução desmineralizante de etilenodiaminotetracetatodissódico (EDTA) a 10% por 12 semanas. A solução foi trocada diariamente até a amostra ser completamente descalcificada.

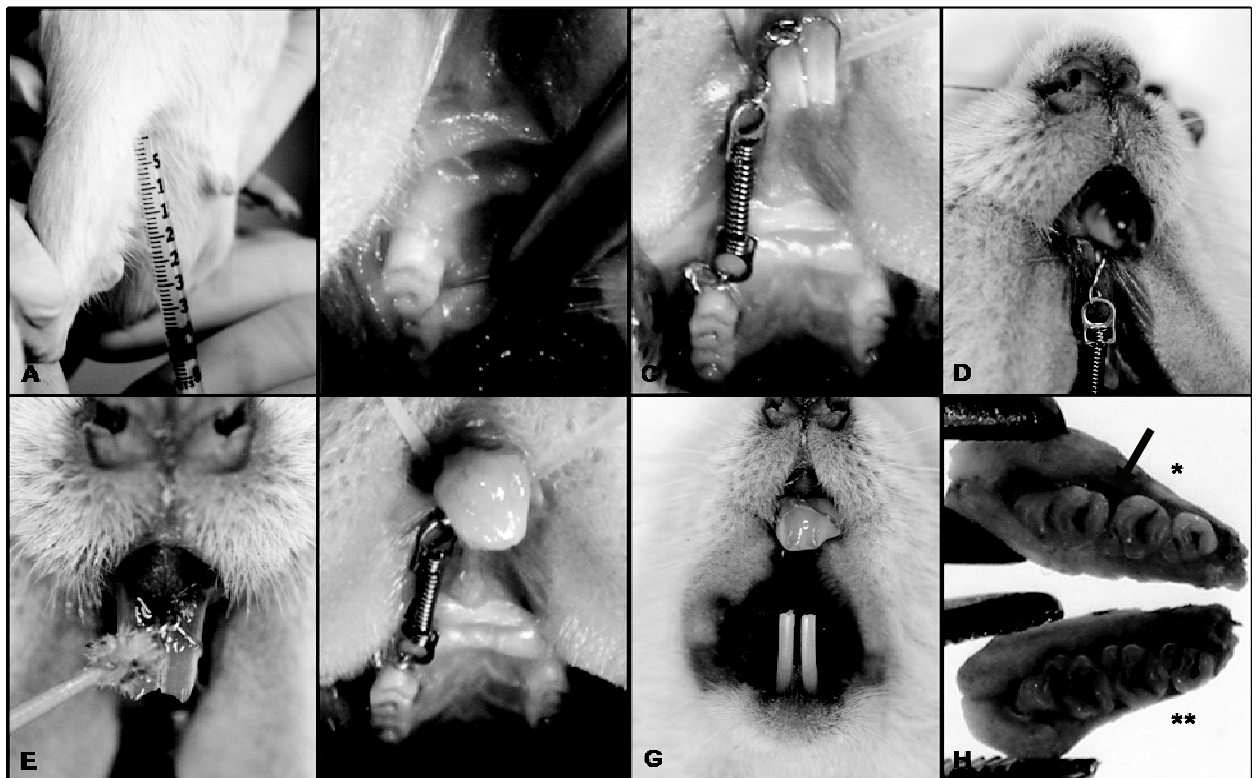


Fig 3. **A**, Aplicação de 0,1UI de HC/kg/dia via subcutânea na região abdominal; **B**, inserção do fio de amarrilho 0,020" por lingual e pelo espaço interproximal entre o primeiro e segundo molar superior direito; **C**, fixação da mola, com o fio de amarrilho circundando a coroa do primeiro molar, fixando uma das extremidades da mola e união da outra extremidade aos incisivos superiores; **D**, condicionamento com ácido fosfórico a 37%; **E**, aplicação do agente de união; **F**, fixação com resina composta; **G**, dispositivo instalado com a incisal dos incisivos inferiores desgastadas; **H*** ↓, diastema entre os molares; **H****, lado oposto.

Os procedimentos operatórios foram realizados na Técnica Operatória do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da PUCPR, sob condições de limpeza, anti-sepsia e desinfecção, com instrumentos esterilizados em autoclave.

Processamento Histotécnico

Após a desmineralização, os espécimes foram processados histologicamente no Laboratório de Patologia Experimental do CCBS da PUCPR. As peças foram lavadas em água corrente por um período de 12 horas e logo mergulhadas em álcool 70°GL. Posteriormente, as peças foram desidratadas em álcool 95°GL por 1 hora, em seguida por álcool absoluto por 1 hora, sendo trocada a solução e permanecendo por mais 2 horas. Concluída a desidratação, as amostras foram diafanizadas duas vezes em xilol por 30 minutos. As peças foram incluídas em parafina histológica para que os cortes transversos na região do terço cervical com 5µm de espessura. Após secagem, as lâminas foram acondicionadas em caixas apropriadas, e armazenadas em ambiente seco e fresco.

Análise Microscópica

Utilizou-se o método de Hematoxilina-Eosina de Harris e Lison, que permitiu realizar análise qualitativa para observar a disposição das fibras colágenas (FC), a morfologia dos fibroblastos (FB) e a presença de reabsorção solapante (RS) no ligamento periodontal (LP) da raiz intermediária vestibular e verificar se havia a presença de áreas hialinas (AH) em todas as raízes do 1^o molar; e análise quantitativa para reconhecer e quantificar os osteoclastos (OC), lacunas de *Howship* (LH) e vasos sanguíneos (VS) presentes ao longo do LP da raiz intermediária vestibular deste dente.

O critério histológico utilizado para identificar células osteoclásticas foi a presença de células eosinofílicas e multinucleadas adjacentes à superfície do osso alveolar (Arias and Márquez-Orosco, 2006⁷) e as lacunas de *Howship* foram consideradas ativas quando estavam próximas às células osteoclásticas.

As análises foram realizadas por um único operador devidamente calibrado que desconhecia o grupo a que cada lâmina pertencia.

⁷ Arias, O.R. and Marquez-Orosco, M.C. (2006) *Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop.*, **130**(3), 364-370.

ANEXO 3 – ILUSTRAÇÕES

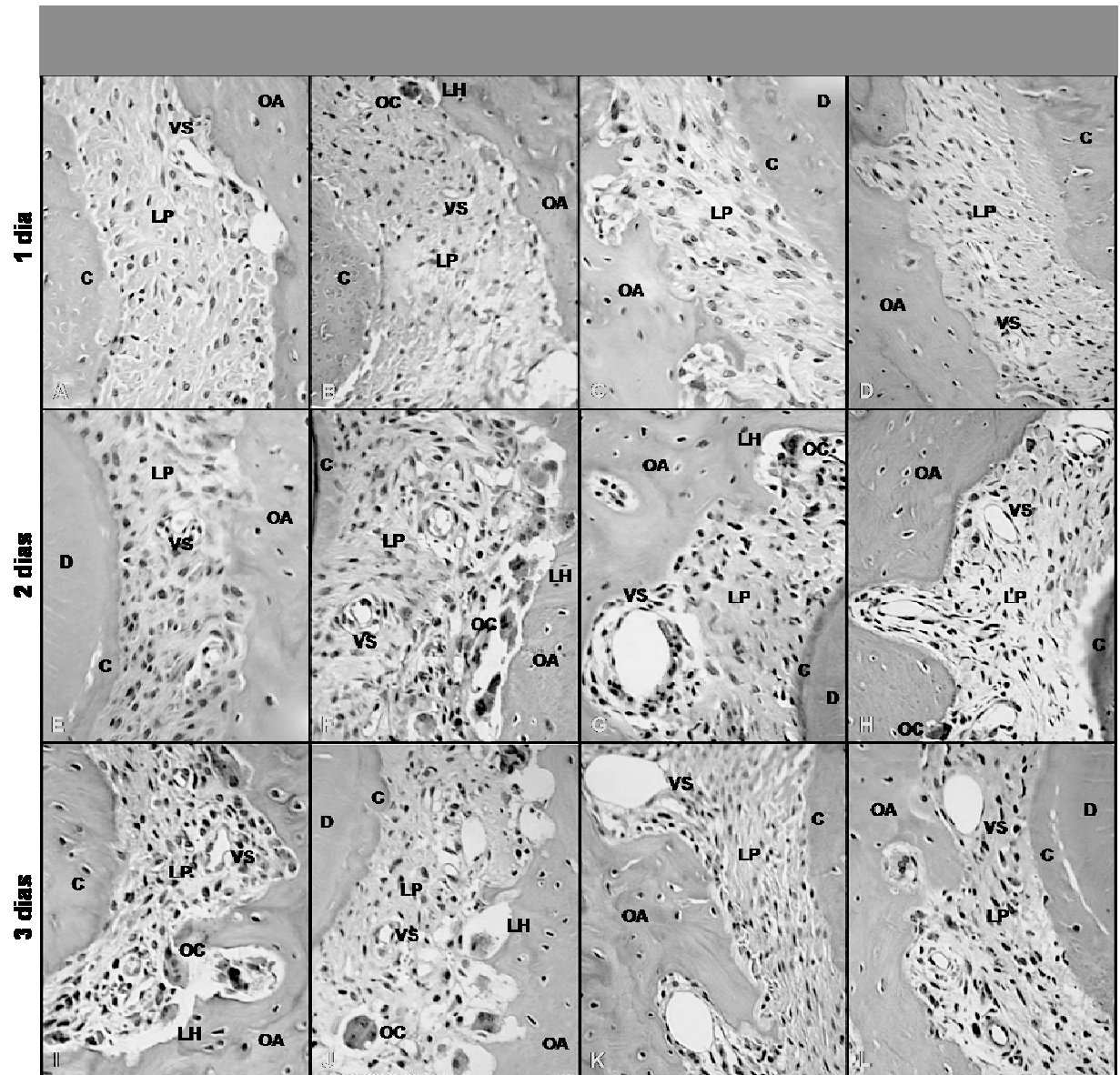


Fig 4. Fotomicrografia dos grupos controle e experimental. **A, B, E, F, I e J**, Área de compressão; **C, D, G, H, K e L**, área de tração; Grupo controle: **A e C**, 1^o dia; **E e G**, 2^o dia; **I e K**, 3^o dia; Grupo experimental: **B e D**, 1^o dia; **F e H**, 2^o dia; **J e L**, 3^o dia; Cimento (C), Dentina (D), Osso Alveolar (OA), Ligamento Periodontal (LP), Vaso Sanguíneo (VS), Osteoclasto (OC) e Lacunas de *Howship* (LH). (H.E. 200x).

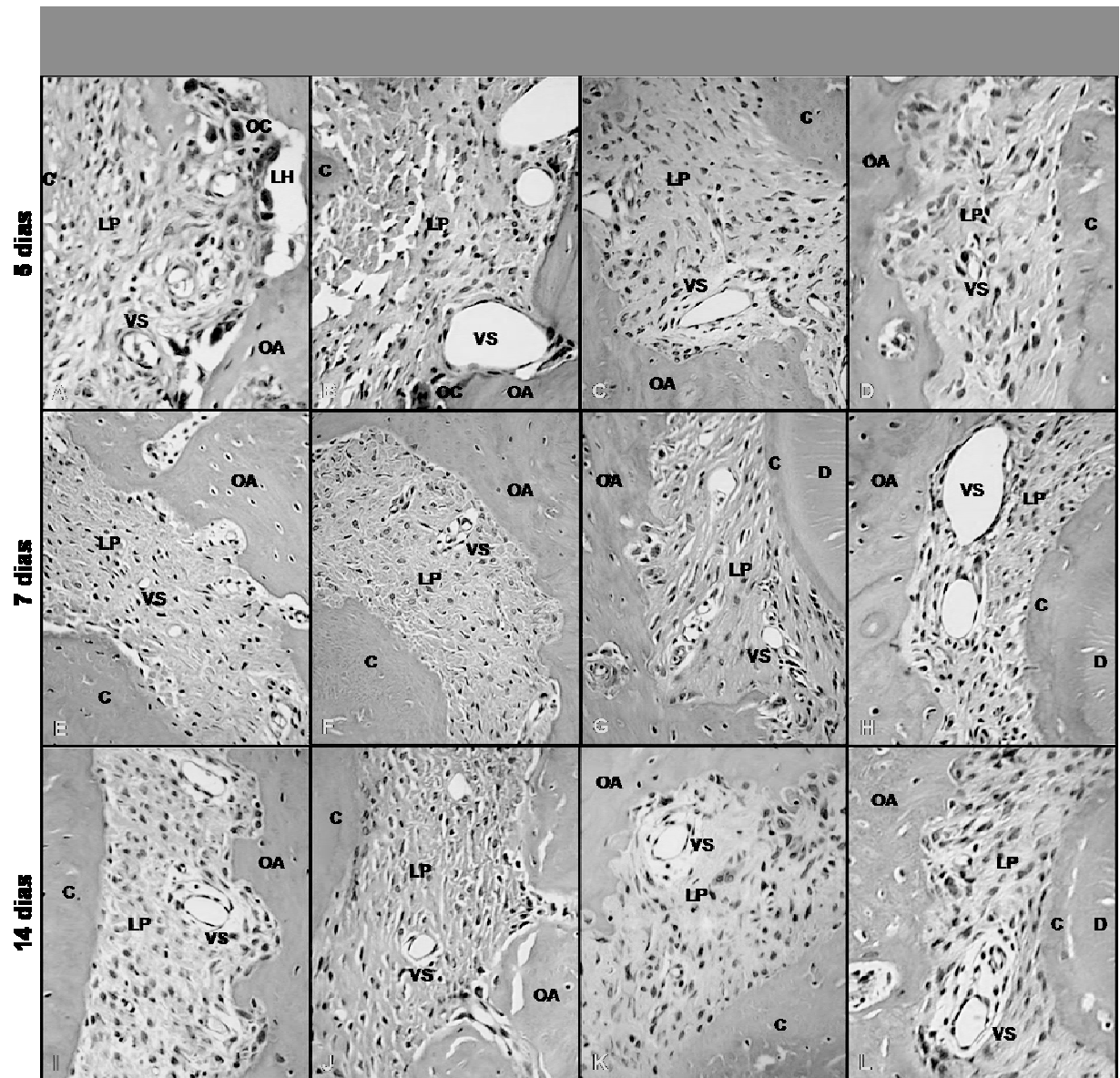


Fig 5. Fotomicrografia dos grupos controle e experimental. **A, B, E, F, I e J**, Área de compressão; **C, D, G, H, K e L**, área de tração; Grupo controle: **A e C**, 5° dia; **E e G**, 7° dia; **I e K**, 14° dia; Grupo experimental: **B e D**, 5° dia; **F e H**, 7° dia; **J e L**, 14° dia; Cimento (C), Dentina (D), Osso Alveolar (OA), Ligamento Periodontal (LP), Vaso Sanguíneo (VS), Osteoclasto (OC) e Lacunas de *Howship* (LH). (H.E. 200x).

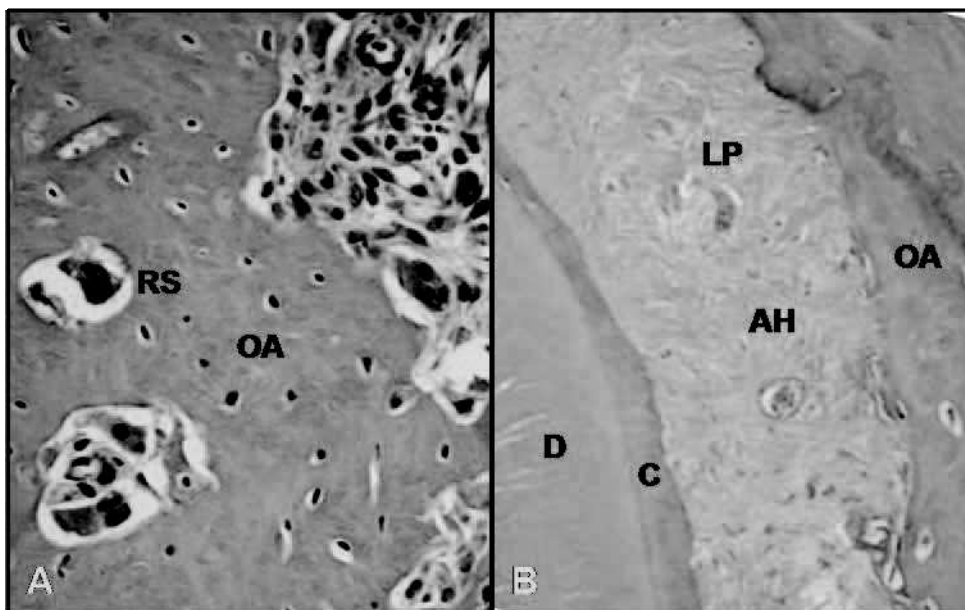


Fig 6. Fotomicrografia do grupo experimental no 2º dia. **A**, Reabsorção Solapante (RS) entre as raízes intermediária vestibular, disto-vestibular e disto-palatina do primeiro molar superior; **B**, Área de Hialinização (AH) no Ligamento Periodontal (LP); Cimento (C), Dentina (D), Osso Alveolar (OA). (H.E. 200x).

ANEXO 4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Gráfico I. Intervalo de confiança (95%) para média de osteoclastos intergrupos e no mesmo período de observação de acordo com o tempo, PUCPR – 2010

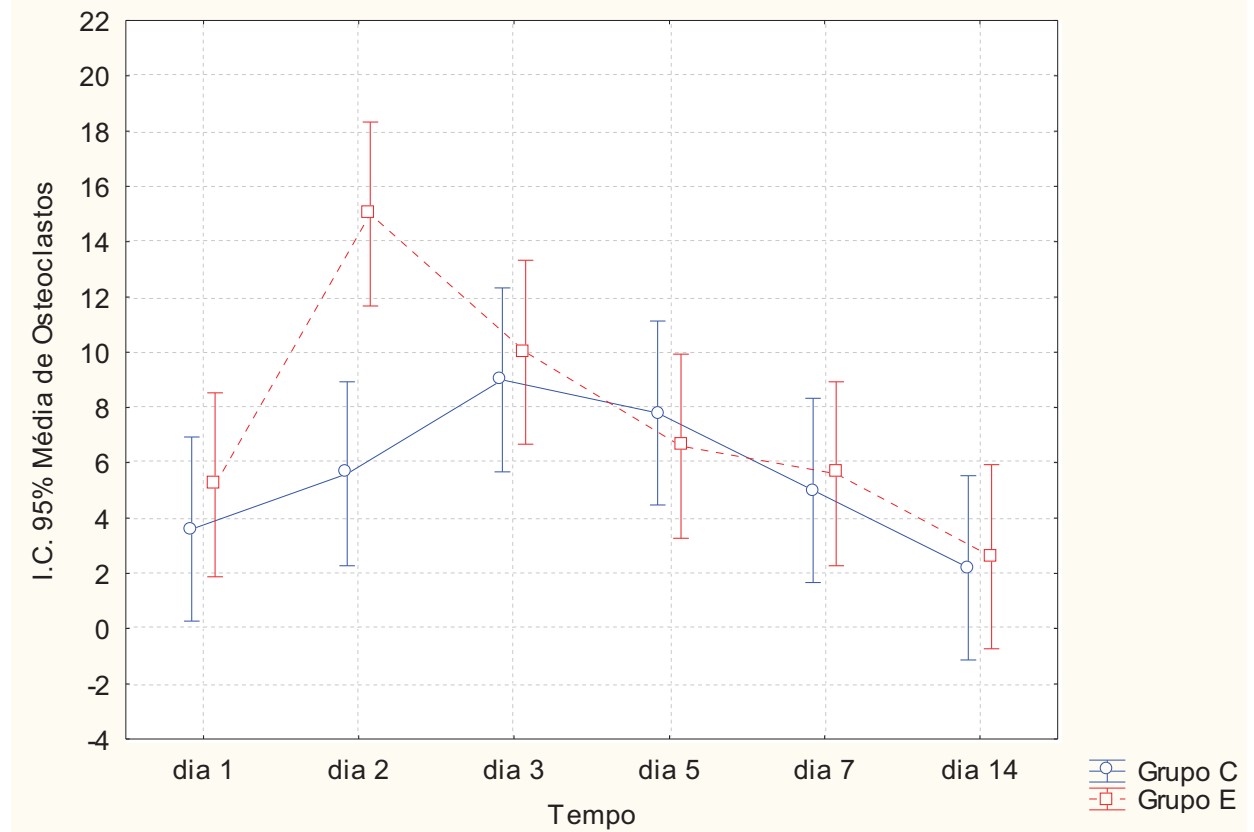


Gráfico II. Intervalo de confiança (95%) para média de lacunas de *Howship* intergrupos e no mesmo período de observação de acordo com o tempo, PUCPR – 2010

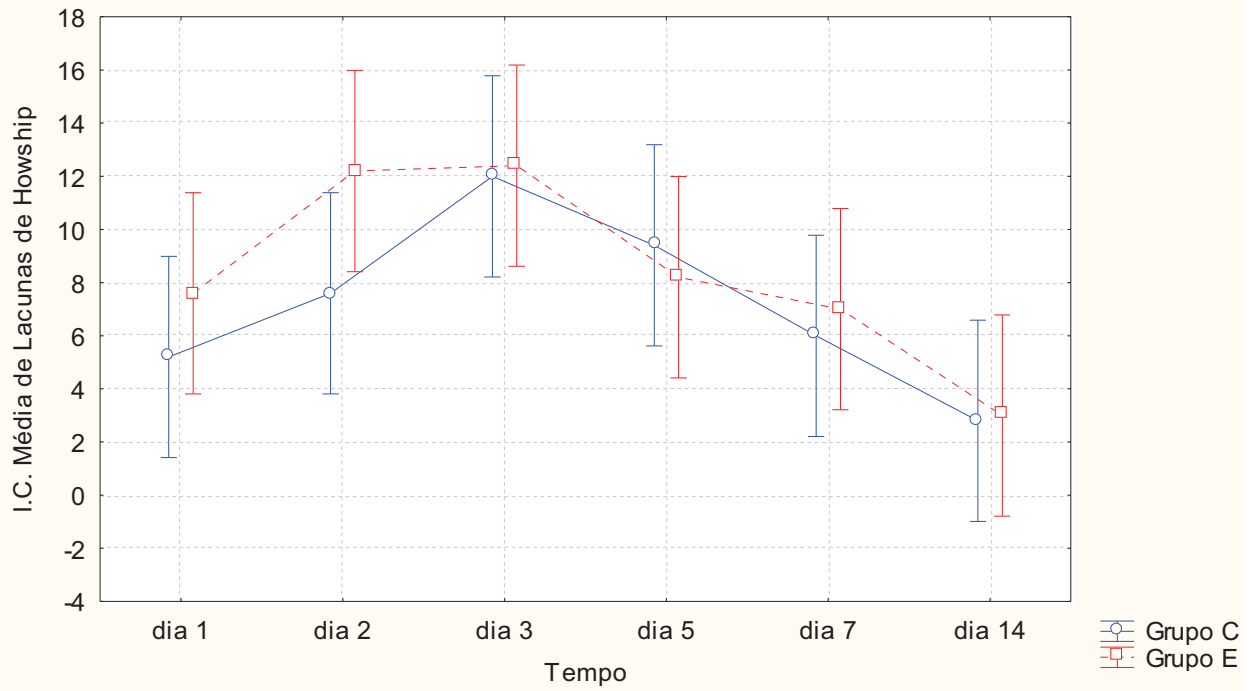


Gráfico III. Diagrama de dispersão entre osteoclastos e lacunas de *Howship*. Teste de correlação de Pearson, PUCPR – 2010

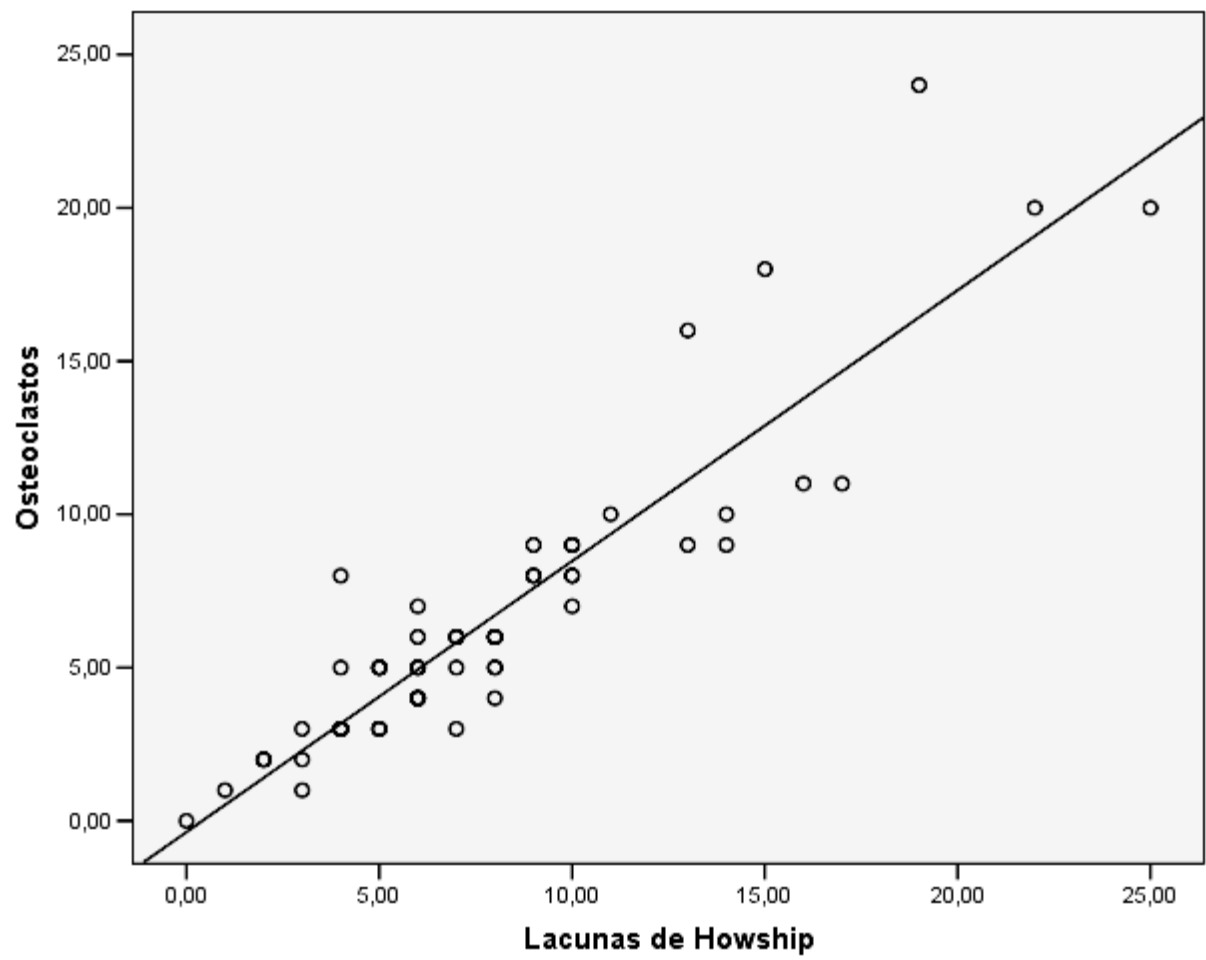
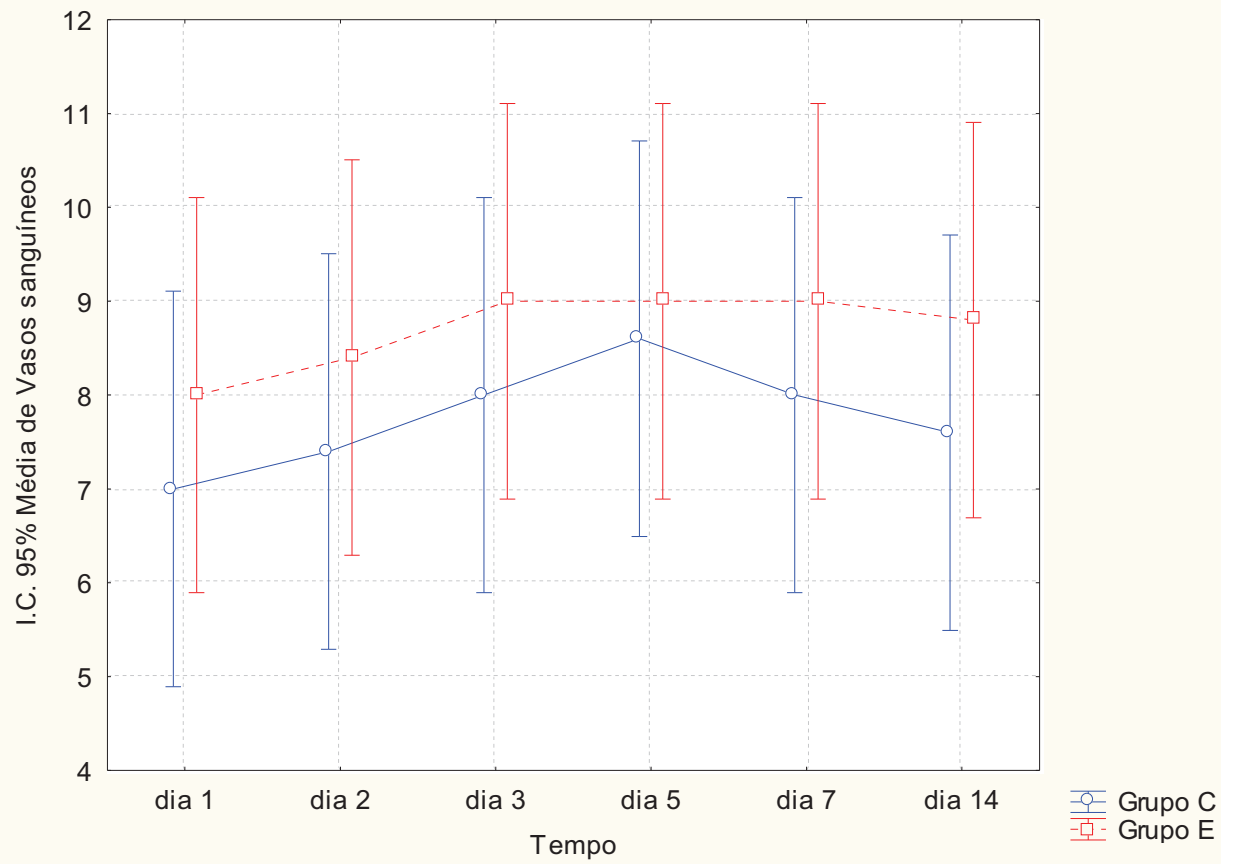


Gráfico IV. Intervalo de confiança (95%) para média de vasos sanguíneos intergrupos e no mesmo período de observação de acordo com o tempo, PUCPR – 2010



ANEXO 5 – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO *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** Editorial Manager website: ees.elsevier.com/ajodo.

Send other correspondence to:

Dr David L. Turpin, DDS, MSD, Editor-in-Chief

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 (206)221-5413

E-mail: dlturpin@aol.com

General Information

The *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* publishes original research, reviews, case reports, clinical material, short communications, 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 the online Editorial Manager: ees.elsevier.com/ajodo. Organize your submission as follows.

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 the Editorial Manager, or submit it via fax or mail.

8. Conflict of interest statement. Report any commercial association that might pose a conflict of interest, such as ownership, stock holdings, equity interests and consultant activities, or patent-licensing situations. 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.

Other Articles

Follow the guidelines above, with the following exceptions, and submit via Editorial Manager.

Case Reports will be evaluated for completeness and quality of records, quality of treatment, uniqueness of the case, and quality of the manuscript. A highquality manuscript will include the following sections: introduction; diagnosis; etiology; treatment objectives, alternatives, progress, and results; and discussion. The submitted figures should include extraoral and intraoral photographs and dental models, panoramic radiographs and tracings from both pretreatment and posttreatment, and progress or retention figures as appropriate.

Short Communications should not exceed 2000 words, including the bibliography, and should include a minimal number of figures or tables. Priority will be given to communications relating to primary research data, preferably clinical but also basic. This section permits time-sensitive material to be published within 6 months of submission.

Techno Bytes items report on emerging technological developments and products for use by orthodontists.

Litigation, Legislation, and Ethics items report legal and ethical issues of interest to orthodontists.

Miscellaneous Submissions

Letters to the Editor and Ask Us questions and answers appear in the Readers' Forum section and are encouraged to stimulate healthy discourse concerning the profession. Send letters or questions directly to the editor, via e-mail:

dlturpin@aol.com. Submit a signed copyright release with the letter, or fax or mail separately.

Brief, substantiated commentary on subjects of interest to the orthodontic profession is occasionally published as a Guest Editorial or Special Article. Send Guest Editorials or Special Articles directly to the editor, via e-mail: dlturpin@aol.com. Submit a signed copyright release with the editorial, or fax or mail separately.

Books and monographs (domestic and foreign) will be reviewed, depending on their interest and value to subscribers. Send books to the Editor of Reviews and Abstracts, Dr Alex Jacobson, University of Alabama School of Dentistry, 1919 7th Ave S, Box 23, Birmingham, AL 35294. They will not be returned.

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)

____ Conflict of interest statement

____ Permissions to reproduce previously published material

Updated June 2009