



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

DOLORES FÁTIMA CAMPOS NAVARRO

**EXPRESSÃO DE IL-1 β NO PERIODONTO DE RATOS
SOB ADMINISTRAÇÃO DE DEXAMETASONA E DICLOFENACO POTÁSSICO
DURANTE A MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA**

CURITIBA

2011

DOLORES FÁTIMA CAMPOS NAVARRO

**EXPRESSÃO DE IL-1 β NO PERIODONTO DE RATOS SOB ADMINISTRAÇÃO
DE DEXAMETASONA E DICLOFENACO POTÁSSICO DURANTE A
MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA**

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

Orientador: Prof. Dr. Odilon Guariza Filho
Co-Orientadora: Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto

CURITIBA

2011

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

C198e
2011 Campos Navarro, Dolores Fátima
Expressão de IL-1 β no periodonto de ratos sob administração de dexametasona e diclofenaco potássico durante a movimentação dentária induzida / Dolores Fátima Campos Navarro ; orientador, Odilon Guariza Filho ; co-orientadora, Paula Cristina Trevilatto. – 2011.
60 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2011
Inclui bibliografias

1. Ortodontia. 2. Dexametasona. 3. Diclofenaco. 4. Movimentação dentária. I. Guariza Filho, Odilon. II. Trevilatto, Paula Cristina. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDD 20. ed. – 617.643



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

TERMO DE APROVAÇÃO

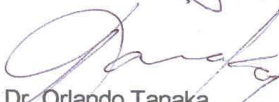
DOLORES FÁTIMA CAMPOS NAVARRO

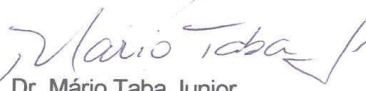
EXPRESSÃO DE IL-1 β SOB ADMINISTRAÇÃO DE DEXAMETASONA E
DICLOFENACO POTÁSSICO DURANTE A MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA
INDUZIDA NO PERIODONTO DE RATOS

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

Orientador(a):


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


Prof. Dr. Orlando Tanaka
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Mário Taba Junior
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, FORP-USP

Curitiba, 21 de fevereiro de 2010.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Pánfilo Campos Bernal e Ninfa Navarro Ramos, que são os melhores Mestres da vida que acompanharam os meus primeiros passos e que sempre acreditaram em mim, que me estimulam, me fortalecem, me mostram meus erros, me escutam com paciência e ajudam nos momentos mais delicados, me proporcionando preciosos momentos na minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) pelo acolhimento e oportunidade de estudar que me deram. Assim à Faculdade de Odontologia – Área de concentração em Ortodontia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa PEC-PG de mestrado sob processo nº 190004/10-0.

Ao diretor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. Sergio Vieira, pelo apoio e confiança dada desde o início e durante o curso inteiro.

Ao Prof. Dr. Odilon Guariza Filho pelos ensinamentos transmitidos desde o início do curso, pela amizade, paciência, pelo empreendimento na orientação, apoio e por acreditar no êxito desta pesquisa.

À Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto pela dedicada orientação, competência e cumplicidade, tempo e atenção dispensada durante todo o desenvolvimento desta dissertação e pela confiança no resultado final deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, pelo imenso amor espalhado em cada dia, de onde vem a força e fé que me faz caminhar da sua mão todos os dias.

A minha família, pais e irmãos Fidel Ernesto, Javier Federico, Gunnar Alejandro e Andres, à minha tia Zenaida e ao meu esposo David Mauricio, pelo carinho e apoio incondicional, cada um à sua maneira, mas sempre presentes, apesar da distancia.

Ao Prof. Dr. Gustavo Garlet pela disposição, tempo e grande aporte com este trabalho.

Ao Prof. Dr. Orlando Tanaka pelos ensinamentos e boa vontade e atenção prestada durante o curso.

À Profa. Dra. Elisa Camargo, exemplo profissional e mãe, gentil e disposta a ajudar em qualquer momento.

Ao Prof. Dr. Hiroshi Mauro pelos ensinamentos e experiência profissional compartilhada.

Aos professores Dra. Luciana Reis de Azevedo Alanis e Dr. Mário Taba, pelas considerações realizadas a respeito deste trabalho.

À minha amiga Prof. Dra. Ana Claudia Melo por ter me acolhido no seu lar e por toda a amizade, carinho e ajuda em momentos que precisei.

Aos meus colegas de turma, em especial a Gabriela Molina pela força e apoio de seguir até o final este árduo trabalho realizado durante o tempo de pesquisa.

À secretária de Pós-Graduação em Odontologia Neide Borges dos Reis pelo carinho, amizade e porque sempre nos ajudou prontamente.

A todas as pessoas que de diferentes maneiras direta ou indiretamente colaboraram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 ARTIGO EM PORTUGUÊS	4
PÁGINA DE TÍTULO	5
RESUMO.....	6
INTRODUÇÃO	7
OBJETIVO	9
MATERIAL E MÉTODOS	10
RESULTADOS.....	13
DISCUSSÃO	14
CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS.....	18
FIGURAS	24
2 ARTIGO EM INGLÊS	28
TITLE PAGE	29
ABSTRACT.....	30
INTRODUCTION.....	31
MATERIAL AND METHODS	33
RESULTS.....	36
DISCUSSION.....	37
CONCLUSION	40
REFERENCES.....	41
FIGURES	47
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	51
ANEXO B – ANÁLISE ESTATÍSTICA COMPLEMENTAR	52
ANEXO C – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO – AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS & DENTOFACIAL ORTHOPEDICS.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% = Porcentagem

°C = Graus Celsius

μL = Microlitro

AIEs = Antiinflamatórios esteroidais

AINEs = Antiinflamatórios não esteroidais

ANOVA = Análise de Variância

C = Controle sem movimento ortodôntico

CEUA = Comitê de Ética no Uso de Animais

CM = Controle com movimento ortodôntico

cN = Centinewton

COX = Ciclooxigenase

COX-1 = Ciclooxigenase-1

COX-2 = Ciclooxigenase-2

Ct = Ciclo threshold

DEPC = Água deionizada livre de RNase

DES = Diferença estatisticamente significativa

DNA = Ácido desoxirribonucleico

cDNA = DNA complementar

DNS = Diferença não estatisticamente significativa

DP = Controle de diclofenaco potássico, sem movimento ortodôntico

DPM = Diclofenaco potássico com movimento ortodôntico

DX = Controle dexametasona sem movimento ortodôntico

DXM = Dexametasona com movimento ortodôntico

et al = E colaboradores

FAO = Fator de ativação dos osteoclastos

FCG = Fluido crevicular gengival

Fig.= Figura

g = gravidade

h = Horas

I.C. = Intervalo de confiança

IFN-γ = Interferon gama

IL = Interleucina

IL-1 = Interleucina - 1

IL-2 = Interleucina - 2

IL-3 = Interleucina - 3

IL-6 = Interleucina - 6

IL-8 = Interleucina - 8

IL-1 α = Interleucina-1 alfa

IL-1 β = Interleucina-1 beta

kg = Quilograma

LP = Ligamento periodontal

min = Minuto

mg = Miligrama

ml = Mililitro

n = Número

ng = Nanograma

NiTi = Níquel-titânio

p = Nível de significância

RT-PCR = Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real

PGE = Prostaglandina

PUCPR = Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ref.= Referência

RNA = Ácido ribonucléico

RNA_m = RNA mensageiro

s = Segundos

TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa

vs = Versus

1 ARTIGO EM PORTUGUÊS

PÁGINA DE TÍTULO

EXPRESSÃO DE IL-1 β NO PERIODONTO DE RATOS SOB ADMINISTRAÇÃO DE DEXAMETASONA E DICLOFENACO POTÁSSICO DURANTE A MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA

RESUMO

Introdução: O movimento dentário induzido é realizado através da aplicação de forças aos dentes, geralmente de pequena magnitude e longa duração. As citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , desempenham um papel regulador na remodelação dos tecidos periodontais durante a movimentação dentária ortodôntica. Pacientes ortodônticos podem estar utilizando medicamentos antiinflamatórios para tratar doenças crônicas ou agudas, o que poderia afetar a expressão de IL-1 β e, por sua vez, a movimentação dentária ortodôntica. **Objetivo:** Analisar os níveis de transcrição gênica de IL-1 β no periodonto de ratos em diferentes fases da movimentação dentária induzida sob tratamento com dexametasona e diclofenaco de potássico. **Métodos:** Em noventa (n = 90) ratos Wistar machos, foi aplicada uma força de 50 cN com uma mola fechada de níquel-titânio para mover para mesial o primeiro molar superior direito. O grupo 1 recebeu doses diárias, 0,5 mg/kg de solução salina ao 0,9%, o grupo 2 recebeu doses diárias de diclofenaco potássico 5 mg/kg e o grupo 3 recebeu doses diárias de dexametasona 0,5 mg/kg. Cada um dos grupos foram subdivididos em 0, 1, 3, 5, 7 e 14 dias. Os níveis de transcrição gênica de IL-1 β foram avaliados por PCR em tempo real e comparações entre os grupos pela ANOVA, $p < 0,05$. **Resultados:** Verificou-se que o estresse mecânico induziu o aumento da transcrição de IL-1 β em cada tempo de tratamento. O diclofenaco potássico e dexametasona provocaram a redução significativa da expressão no dia 1, mas apenas o diclofenaco potássico foi capaz de reduzir os níveis de transcrição do gene no dia 5. Nos dias 7 e 14, não houve diferença comparado com os controles. **Conclusão:** O presente estudo mostrou evidências de que forças mecânicas induzem o aumento da expressão de IL-1 β nos tecidos periodontais de ratos. Além disso, os medicamentos antiinflamatórios, tais como diclofenaco potássico e dexametasona, foram capazes de reduzir tais níveis na fase inicial da movimentação dentária induzida.

Palavras-chaves: Interleucina-1, Movimentação Dentária, Antiinflamatórios

INTRODUÇÃO

O movimento dentário induzido é realizado através da aplicação de forças aos dentes, geralmente de pequena magnitude e longa duração.¹ Na fase inicial da movimentação dentária induzida há uma resposta inflamatória aguda, caracterizada pela vasodilatação dos capilares e migração de leucócitos, do periodonto. Esta migração celular produz a síntese e secreção de substâncias diversas, incluindo as prostaglandinas (PGE), fatores de crescimento e citocinas.² Como resultado, acontece a remodelação de tecidos periodontais, possibilitando o movimento dentário.³ Ao nível celular, a remodelação do periodonto é composta de reabsorção óssea adjacente ao ligamento periodontal (LP) na zona de compressão, aposição óssea na zona de tensão, degeneração e restabelecimento do LP,⁴ e diversas citocinas e hormônios desempenham um papel importante em todo este processo.⁵

As citocinas afetam o metabolismo ósseo e, conseqüentemente, a movimentação dentária induzida, incluindo a interleucina (IL), como as IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e interferon gama (IFN- γ).¹ Ambas as formas IL-1 α e IL-1 β são mais potentes na estimulação da reabsorção óssea que o TNF- α .⁶

A interleucina-1beta (IL-1 β) foi uma das primeiras citocinas a ser descrita, induzindo a expressão de uma variedade de genes e a síntese de diversas proteínas.⁷ É um mediador chave na fase aguda da reação inflamatória,⁸ expressa em grandes quantidades pelos macrófagos,⁹ fibroblastos¹ e osteoclastos.¹⁰ Esta citocina pró-inflamatória é membro do antigamente conhecido fator de ativação dos osteoclastos (FAO) e está envolvida no processo de remodelação óssea. A referida citocina, IL-1 β , age de forma autócrina/parácrina para regular a expressão dos fatores de transcrição, citocinas, moléculas reguladoras do crescimento e enzimas envolvidas na diferenciação e na função de células mesenquimais e outros tipos de células.³

A maior incidência e prevalência de muitas doenças crônicas (asma, diabetes, e artrite, por exemplo) têm aumentado nos últimos anos, em parte porque a população está com maior expectativa de vida, mas também, em alguns casos, porque é menos saudável. Neste contexto, os médicos cada vez mais estão tratando estas doenças crônicas com medicamentos.¹¹ O movimento dentário induzido é

afetado por alguns medicamentos; por exemplo, aqueles que interferem com a cascata do ácido araquidônico, como os antiinflamatórios esteroidais (AIEs) e não esteroidais (AINEs), que podem inibir a movimentação dentária induzida, diminuindo o número de osteoclastos, provavelmente pela inibição de prostaglandinas.¹² Assim, também interferem com a formação de matriz óssea, reduzindo a organização de colágeno e maturação na fase inicial da movimentação dentária.¹³ Então, é fundamental conhecer quais os medicamentos que um paciente ortodôntico está usando ou vai usar.¹⁴

Visto que um número crescente de indivíduos necessita de tratamento ortodôntico e, ao mesmo tempo, o uso de medicamentos como o AIE e AINE para tratamento de doenças crônicas ou agudas, são necessários estudos sobre os efeitos dos vários medicamentos na movimentação dentária ortodôntica, especialmente em animais de experimentação.¹⁵

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi analisar os níveis de transcrição gênica da interleucina-1 β (IL-1 β) no periodonto de ratos com movimento dentário induzido, em diferentes estágios da movimentação, sob tratamento com dexametasona e diclofenaco de potássico.

MATERIAL E MÉTODOS

Movimento ortodôntico induzido

Noventa (n = 90) ratos Wistar machos com três meses de vida (peso médio entre 300 a 350g) foram acomodados em gaiolas de polycarbonato (três ratos por gaiola) sob controle de fotoperíodo com ciclo de 12/12-h claro/escuro, a temperaturas entre 19 °C e 22 °C. Todos os animais foram alimentados com uma dieta em pó para prevenir fraturas no aparelho ortodôntico e água da torneira *ad libitum* durante o período experimental. O estudo foi conduzido sob aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), aprovado sob protocolo CEUA-PUCPR Nº 507.

A movimentação dentária induzida foi produzida pela ação de uma mola fechada de níquel-titânio (NiTi) (3M Unitek, ref. 344-150, Califórnia.), com uma força de 50 cN de magnitude¹⁶⁻¹⁸ para mover mesialmente o primeiro molar superior direito (Fig. 1). A força foi medida utilizando um dinamômetro (Dentaurum, número 1005004, Ispringen, Deutschland). Não houve reativação durante o período experimental. A mola foi instalada quando o animal foi sedado por injeção intramuscular de 1,8 mg/kg de ketamina (Vetanarcol ®, König, Avellaneda, Argentina) e 1,1 mg/kg de xilazina (Rompun ®, Bayer, São Paulo, Brasil).

Os primeiros molares superiores direitos de todos os ratos receberam o dispositivo ortodôntico e foram divididos em grupos: CM (controle com movimento ortodôntico), DPM (diclofenaco potássico com movimento ortodôntico), e DXM (dexametasona com movimento ortodôntico). Os primeiros molares esquerdos não receberam nenhuma força e serviram como controle do lado contralateral, de acordo com Bletsa et al. (2006) e Lee et al. (2009), e foram divididos em grupos C (controle, sem movimento ortodôntico), DP (controle de diclofenaco potássico, sem movimento ortodôntico) e DX (controle dexametasona sem movimento ortodôntico). Cada um dos grupos experimentais foi subdividido em 0, 1, 3, 5, 7 e 14 dias de movimentação dentária induzida (5 animais por subgrupo).

Os animais dos grupos C e CM receberam doses diárias de solução salina 0,9% (0,5 mg/kg) para simular o estresse da injeção, iniciando cinco dias antes da instalação da mola. Nos grupos DP e DPM, os ratos receberam doses diárias (5 mg/kg) de diclofenaco de potássio (Cataflam®, do laboratório. Novartis

Biociências, São Paulo-SP, Brasil) via intramuscular, iniciando cinco dias antes da instalação da mola.^{13,21} Finalmente, os grupos de DX e DXM receberam doses diárias (0,5 mg/kg) de dexametasona (Decadron®, do laboratório Aché SA, Guarulhos-SP, Brasil) via intramuscular, também iniciando cinco dias antes da inserção do aparelho ortodôntico.²²⁻²³

Os grupos de ratos foram mortos com uma sobredose de anestésico (ketamina, 5,4 ml/kg) em 0, 1, 3, 5, 7 e 14 dias após a instalação da mola. A maxila foi imediatamente dissecada e os tecidos moles aderentes foram removidos. Os primeiros molares superiores esquerdo e direito, incluindo o seu periodonto circundante (LP e osso alveolar), foram cortados como um bloco, todos do mesmo tamanho.

Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (PCR)

A extração total de RNA dos tecidos dentais e periodontais (incluindo osso alveolar, ligamento periodontal e cimento) foi realizada, utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen, Califórnia), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Resumidamente, o bloco foi triturado em um gral e pistilo de porcelana durante 30 s e imediatamente foi adicionado Trizol (1 ml com 1 mg de tecido). Foi adicionado para cada 1 ml da suspensão, 0,2 ml de clorofórmio (Sigma Co., St. Louis, MO) e centrifugado a 12.000g por 15 min a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, ao qual o mesmo volume de isopropanol foi adicionado. A amostra foi agitada, incubada por 20 min a 20 °C e novamente centrifugada como descrito anteriormente. A precipitação foi lavada em etanol 75% e secada à temperatura ambiente. As amostras de RNA foram suspensas em 40 µl de água deionizada livre de RNase (DEPC) 1 ml foi usado para obter a concentração de RNA/µl nas amostras. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando 3 µg de RNA através de uma reação de transcrição reversa (Superscript III; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) como descrito anteriormente (24). Foi realizada a Reação em cadeia de polimerase em Tempo Real (PCR) para análise quantitativa do RNA mensageiro (RNAm) em um ABI Prism 7000 Sequence Detection System usando o sistema SybrGreen (Applied Biosystems, Warrington, UK). SybrGreen PCR MasterMix (Applied Biosystems), 100 nM primers específicos, e de 2,5 ng de DNAc (ou 5 ng de DNA) foram utilizados em cada reação.

As sequências dos primers, os tamanhos dos *amplicons*, e as temperaturas de fusão e anelamento, foram projetados usando o software Primerexpress (Applied Biosystems). As condições padrão de PCR foram de 95 °C (10 min), seguidos por 40 ciclos de 94 °C (1 min), 56 °C (1 min), e 72 °C (2 min), e pela curva de desnaturação padrão. Para a análise do RNAm, nível relativo da expressão gênica foi calculado em referência à expressão da beta-actina na amostra, utilizando o método ciclo threshold (Ct).

Para a análise de DNA, os níveis de expressão gênica foram determinados utilizando o método de Ct. Os controles negativos sem cDNA, e sem transcrição reversa, também foram realizados. Um experimento representativo de três é apresentado nos resultados.

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o Statistical Package to Social Sciences 18,0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL) e Estatística 8 (Statsoft, Inc.Tulsa, OK). O teste ANOVA foi utilizado para comparar as diferenças nos valores médios das variáveis de níveis de transcrição de IL-1 β entre os grupos C, DP, DX, com presença ou ausência de mola produzindo movimentação dentária ortodôntica (ausente, presente) e tempo (dias 0, 1, 3, 5, 7 e 14). Para verificar a homogeneidade, o teste de Levene foi utilizado. O teste de Games-Howell foi utilizado para identificar diferenças entre grupos, com um nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

Quando a expressão de IL-1 β foi analisada nos grupos estratificados pela presença de mola e pelo uso de drogas, mas não pelos dias de tratamento, verificou-se que os níveis de transcrição de IL-1 β foram aumentados quando comparados CM em relação ao C ($p = 0,000$), DPM comparado com DP ($p = 0,000$) e na comparação DXM com DX ($p = 0,000$) (Fig. 2). Considerando o uso de drogas AINE e AIE, não foi observada diferença estatisticamente significativa (DNS) entre C e DP ($p = 0,372$), C e DX ($p = 0,825$), e entre DP e DX ($p = 0,720$) (Fig. 2).

Quando a expressão de IL-1 β foi comparada segundo dias de tratamento, não estratificada pela presença ou ausência de mola e administração de drogas, constatou-se que os níveis de transcrição aumentaram nos dias 1 ($p = 0,001$), 3 ($p = 0,001$), 5 ($p = 0,003$), 7 ($p = 0,001$) e 14 ($p = 0,001$) em relação ao dia zero. Houve uma expressão similar nos dias 1, 3, 5. No entanto, no dia 7, os níveis de expressão começaram a diminuir consideravelmente em comparação com o dia 5 ($p = 0,012$) e mantiveram-se baixos no dia 14 com moderada redução ($p = 0,006$) (Fig. 3).

Quando as amostras foram estratificadas por três variáveis: i) presença ou ausência de mola, ii) uso de drogas, e iii) tempo de tratamento, a expressão de IL-1 β mostrou diferença estatisticamente significativa (DES) entre os grupos com e sem mola, em cada tempo de tratamento ($p < 0,05$). Comparado as três variáveis entre os grupos submetidos à movimentação dentária, verificou-se que diminuição da expressão de IL-1 β em DPM quando comparada com CM ($p = 0,001$) e DXM comparada com CM ($p = 0,030$) no dia 1; além disso, DNS entre DPM e DXM foi encontrada. DNS foi encontrada entre CM, DPM e DXM no dia 3. No entanto, verificou-se DES no DPM versus CM ($p = 0,000$) e DPM versus DXM ($p = 0,007$) no dia 5. Aos 7 e 14 dias, DNS foi encontrada entre o CM, o DPM e DXM (Fig. 4). Embora DPM começou a diminuir no dia 5 em comparação com o dia 3 ($p = 0,000$), DXM começou a diminuir no dia 7 ($p = 0,001$) em comparação com o dia 5 (Fig. 4). No entanto, nos grupos que não receberam a droga, a expressão de IL-1 β diminuiu no dia 7 (Fig. 4).

DISCUSSÃO

A movimentação dentária ortodôntica depende diretamente das mudanças que ocorrem no ligamento periodontal, que é um tecido conjuntivo altamente vascularizado e celularizado que une a raiz do dente ao osso alveolar circundante.²⁵ O complexo processo que envolve a remodelação óssea é afetado por citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, a IL-1 β (1). Algumas drogas, como AIEs e AINEs, podem influenciar o movimento dentário; portanto, os ortodontistas devem estar cientes desta interação.¹⁴ Para investigar as mudanças na expressão de IL-1 β durante a remodelação periodontal devido à movimentação dentária sob medicação de AINE e AIE, o periodonto de ratos submetidos à movimentação dentária ortodôntica induzida foi estudado.

Muitos estudos sobre a movimentação dentária têm sido realizados em modelo experimental, particularmente com ratos,^{13,16-17,20} que ainda continua sendo o modelo de escolha, apesar de algumas limitações anatômicas e fisiológicas.²⁶ Os primeiros molares superiores direitos de todos os ratos receberam o aparelho ortodôntico e os primeiros molares esquerdos não receberam aparelho e serviram como controle, lado contralateral, como mostrado em estudos anteriores.^{19,27}

Foi proposto que a IL-1 β , produzida localmente por células ativadas mecanicamente, é responsável por mediar as fases (reabsorção e formação) de remodelação do tecido conjuntivo.^{1,28} A imunolocalização da IL-1 β nos tecidos periodontais de dentes caninos de gatos seguida à aplicação de uma força de inclinação¹⁹ forneceu a primeira evidência experimental de apoio a esta hipótese. Estudos experimentais posteriores^{22,30} e estudos clínicos no fluido crevicular gengival (FCG)³¹⁻³³ têm demonstrado que a IL-1 β é elevada durante o movimento ortodôntico dentário. De acordo com os estudos previamente mencionados, nossos resultados mostraram que a força mecânica, no lado com a acção da mola, induziu aumento da expressão de IL-1 β em todos os dias de movimentação dentária induzida, mas não no lado contralateral.

Em fases iniciais de ativação do aparelho, os níveis de IL-1 β nos dentes controle e experimentais mostraram um aumento significativo em 24 h.³¹⁻³⁴ O nível máximo de citocinas foram detectadas no dia 3 após a aplicação de força ortodôntica,³⁴⁻³⁵ reduzindo em até 7 dias.³¹⁻³⁴ Então, eles baixaram ao nível basal

entre 14-28 dias.³⁵ Em nossos achados, nos dentes controle e experimentais, também foi observado que os níveis de transcrição do gene IL-1 β aumentaram nos dias 1, 3, 5, e diminuíram significativamente no dia 7, mantendo-se baixos no dia 14, considerando-se ambos os grupos, com ou sem mola, e com e sem o uso de drogas. A mola não requereu reativação durante o experimento. Esse fato pode explicar a razão que os níveis de IL-1 β diminuíram a partir do dia 7.³⁴

Os níveis de IL-1 β aumentaram rapidamente no FCG em humanos e a PGE teve seu pico de produção mais tarde (24-48 horas), sugerindo que a IL-1 β pode aumentar a produção de PGE no estresse mecânico do ligamento periodontal.^{30,-31} A inibição da ciclooxygenase resultou na exacerbação da produção de colagenase e atividade mediada pela IL-1 β , bem como a atenuação de níveis de síntese de procolágeno tipo IV pelas células endoteliais in vitro.³⁶ A supressão de formação óssea com AINE pode ser devida à inibição da ciclooxygenase-1 (COX-1) e ciclooxygenase-2 (COX-2) ou através de vias não identificadas.^{13,37} Foi demonstrado em ratos que ambos os inibidores específicos da COX-2, rofecoxib, e inespecífico de COX, diclofenaco, foram eficazes para inibir a movimentação dentária.^{16,38} Além disso, o diclofenaco reduziu o número de osteoblastos nos primeiros estágios da cicatrização óssea.²¹

Estudos mostram que o uso de corticosteróides administrados em ratos Wistar adultos com aparelho não afetou a magnitude do movimento dentário ortodôntico em comparação com os controles.³⁹ Em contrapartida, foi descrito que a movimentação dentária em ratos foi inibida pela hidrocortisona.⁴⁰ O tratamento agudo com corticosteróide reduziu a reabsorção e formação óssea, com estímulo mecânico, enquanto que o tratamento crônico com esteróides levou a uma reação biológica aumentada à perturbação mecânica, indicando que o nível de força ortodôntica deve ser reduzida e controlada com mais frequência em pacientes sob tratamento crônico com esteróides.²⁷ O efeito dos corticosteróides sobre os componentes do osso continua a ser elucidado. Foi sugerido que a dexametasona inibe a produção dos osteoclastos.⁴¹ No entanto, existem controvérsias quanto aos efeitos dos corticosteróides sobre o movimento dentário. Também foi sugerido que a dexametasona aumenta a osteoclastogênese e estimula a reabsorção óssea.⁴²

Nosso estudo mostrou que a expressão de IL-1 β sob movimentação ortodôntica diminuiu significativamente no dia 1 em grupos com diclofenaco e

dexametasona, e no dia 5 em grupos usando o diclofenaco. No dia 5, os níveis de IL-1 β no diclofenaco reduziram significativamente, mais que a dexametasona. No entanto, a falta de significância no grupo com dexametasona em relação ao grupo controle pode ser devido ao grande espectro de variação na expressão observado no grupo dexametasona. A expressão com o uso de medicamentos não diferiu entre os grupos que não receberam a mola (Fig. 4).

Uma das limitações deste estudo foi a inclusão de dentes ao invés de apenas os tecidos periodontais (ligamento periodontal, osso alveolar e cimento), o que seria a estrutura onde o fenômeno de remodelação ocorre. Embora o movimento ortodôntico possa afetar a polpa dentária, induzindo alterações vasculares,⁴³⁻⁴⁴ a expressão de IL-1 β em tecidos pulpaes pode não ser afetadas, como mostrado em um estudo que investigou lesões periapicais, que representa uma condição inflamatória.⁴⁵

O presente estudo mostrou um aumento nos níveis de transcrição do gene IL-1 β em grupos sob movimentação dentária induzida e um decréscimo nos grupos sob uso de drogas no dia 1 e 5. Como mencionado anteriormente, a IL-1 β aumenta a produção de prostaglandina e induz a remodelação do osso alveolar e LP durante a movimentação dentária previa à produção de nova matriz extracelular.²⁵ Assim, a movimentação dentária pode ser modificada pelo entorno médico do paciente ou pela medicação prescrita.⁴⁶ Embora a extrapolação a partir da resposta de ratos ao paciente seja complexa, o ortodontista deve identificar esses pacientes cuidadosamente, questionando-os sobre seu histórico de medicação. Seguindo os resultados obtidos recomenda-se que a investigação deve ser parte de cada diagnóstico ortodôntico e útil para a prática clínica.

CONCLUSÃO

O presente estudo mostra as seguintes evidências:

1. O movimento dentário induzido leva ao aumento da expressão da IL-1 β nos tecidos periodontais de ratos.
2. O movimento dentário induzido em ratos sob a ação de drogas antiinflamatórias, tais como o diclofenaco potássico e a dexametasona inibiram a expressão da IL-1 β , no processo inflamatório durante as fases iniciais da movimentação dentária.

REFERÊNCIAS

1. Davidovitch Z. Tooth Movement. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1991;2(4):411-50.
2. Krishnana V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006 Apr;129(4):469.e1-32.
3. Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod*. 2006 Jun;28(3):221-40. Epub 2006 May 10.
4. Thilander B, Rygh P, Reitan K. Tissue reactions in orthodontics. In: Graber T, Varnarsdall R. *Orthodontics. Current principles and techniques*. 3rd eds. St Louis, MO: Mosby; 2000.117-92.
5. Sandy JR, Farndale RW, Meikle MC. Recent advances in understanding mechanically induced bone remodeling and their relevance to orthodontic theory and practice. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1993 Mar;103(3):212–22.
6. Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RL, J, Ago JM. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol*. 1987 Mar;138(5):1464-8.
7. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*. 1991 Apr;77(8):1627-52.
8. Dewhirst FE, Stashenko PP, Mole JE, Tsurumachi T. Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1 beta. *J Immunol*. 1985 Oct;135(4):2562-8.
9. Del Pozo V, De Andres B, Martin E, Maruri N, Zubeldia JM, Palomino P, Lahoz C. Murine eosinophils and IL-1: alpha IL-1 mRNA detection by in situ hybridization. Production and release of IL-1 from peritoneal eosinophils. *J Immunol*. 1990 Apr;144(8) 3117-22.

10. Uy HL, Dallas M, Calland JW, Boyce BF, Mundy GR, Roodman GD. Use of an In Vivo Model to Determine the Effects of Interleukin-1 on Cells at Different Stages in the Osteoclast Lineage. *J Bone Miner Res.* 1995 Feb;10(2):295-301.
11. Findlay S, Sherman D, Chockley N, Watkins S. Prescription drug expenditures in 2001: Another year of escalating costs. The National Institute for Health Care Management Research and Educational Foundation. 2002 May. 1-19.
12. Arias OR, Marquez-Orozco MC. Aspirin, acetaminophen, and ibuprofen: Their effects on orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006 Sep;130(3):364-70.
13. Retamoso LB, Montagner F, Camargo ES, Vitral RW, Tanaka OM. Polarized light microscopic analysis of bone formation after inhibition of cyclooxygenase 1 and 2. *Anat Rec (Hoboken).* 2010 Feb;293(2):195-9.
14. Schwartz JE. Ask Us: Some drugs affect tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2005 Jun;127(6):644.
15. Bartzela T, Türp JC, Motschall E, Maltha JC. Medication effects on the rate of orthodontic tooth movement: A systematic literature review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009 Jan;135(1):16-26.
16. Gameiro GH, Nouer DF, Pereira Neto JS, Siqueira VC, Andrade ED, Novaes PD, et al. Effects of Short and Long Term Celecoxib on Orthodontic Tooth Movement. *Angle Orthodontist.* 2008 Sept;78(5):860-5.
17. Gonzales C, Hotokezaka H, Matsuo KI, Shibazaki T, Yozgatian JH, Darendeliler MA, et al. Effects of Steroidal and Nonsteroidal Drugs on Tooth Movement and Root Resorption in the Rat Molar. *Angle Orthod.* 2009 Jul;79(4):715-26.
18. King GJ, Keeling SD. Orthodontic bone remodeling in relation to appliance decay. *Angle Orthod.* 1995 Apr;65(2):129-40.

19. Bletsa A, Berggreen E, Brudvik P. Interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α expression during the early phases of orthodontic tooth movement in rats. *Eur J Oral Sci.* 2006 Oct;114(5): 423-9
20. Lee TY, Lee KJ, Baik HS. Expression of IL-1 β , MMP-9 and TIMP-1 on the pressure side of gingiva under orthodontic loading. *Angle Orthod.* 2009 Jul;79(4):733-9.
21. Krischak GD, Augat P, Blakytyn R, Claes L, Kinzl L, Beck A. The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac reduces appearance of osteoblasts in bone defect healing in rats. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2007 Aug;127(6):453-8.
22. Omoigui S. *The pain drugs handbook.* St. Louis: Mosby; 1995. 603p.
23. Allen DG, Pringle JK, Smith DA. *Handbook of Veterinary Drugs.* 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. 866p.
24. Cardoso CR, Garlet GP, Moreira AP, Junior WM, Rossi MA, Silva JS. Characterization of CD4⁺ CD25⁺ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J Leukoc Biol.* 2008 Jul; 84(1): 311-8.
25. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res.* 2002 Feb;17(2):210-20.
26. Ren Y, Jaap C, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. The rat as a model for orthodontic tooth movement-a critical review and a proposed solution. *Eur J Orthod.* 2004 Oct;26(5):483-90.
27. Kalia S, Melsen B, Verna C. Tissue reaction to orthodontic tooth movement in acute and chronic corticosteroid treatment. *Orthod Craniofac Res.* 2004 Feb; 7(1):26-34.
28. Meikle MC, Heath JK, Atkinson SJ, Hembry RM, Reynolds JJ. Molecular biology of stressed connective tissues at sutures and hard tissues in vitro. In:

- Norton LA, Burstone CJ. The biology of tooth movement. Boca Raton: CRC Press; 1989. p.71-86
29. Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL. Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dent Clin North Am.* 1988 Jul;32(3):411-35.
 30. Saito M, Saito S, Ngan PW, Shanfeld J, Davidovitch Z. Interleukin 1 beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1991 Mar; 99(3):226-40.
 31. Grieve III WG, Johnson GK, Moore RN, Reinhardt RA, Dubois LM. Prostaglandin E (PGE) and interleukin-IL1 β (IL-1 β) levels in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1994 Apr;105(4):369-74.
 32. Uematsu S, Mogil M, Deguchi T. Interleukin (IL)-1, IL-6, Tumor Necrosis Factor- α , Epidermal Growth Factor, and 2-Microglobulin Levels Are Elevated in Gingival Crevicular Fluid during Human Orthodontic Tooth Movement. *J Dent Res.* 1996 Jan;75(1):562-7.
 33. Lee KJ, Park YC, Yu HS, Choi SH, Yoo YJ. Effects of continuous and interrupted orthodontic force on interleukin-1 β and prostaglandin E2 production in gingival crevicular fluid. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004 Feb;125(2):168-77.
 34. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhtiet M. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001 Mar;119(3):307-12.
 35. Iwasaki LR, Haack JE, Nickel JC, Reinhardt RA, Petro TM. Human interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist secretion and velocity of tooth movement. *Arch Oral Biol.* 2001 Feb;46(2):185-9.
 36. Kyrkanides S, O'Banion MK, Subtelny JD. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in orthodontic tooth movement: metalloproteinase activity and collagen

- synthesis by endothelial cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2000 Aug;118(2):203-9.
37. Goodman S, Ma T, Trindade M, Ikenoue T, Matsuura I, Wong N, et al. COX-2 selective NSAID decreases bone ingrowth in vivo. *J Orthop Res.* 2002 Nov;20(6):1164-9.
 38. De Carlos F, Cobo J, Díaz-Esnal B, Arguelles J, Vijande M, Costales M. Orthodontic tooth movement after inhibition of cyclooxygenase-2. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006 Mar;129(3):402-6.
 39. Ong CKL, Walsh LJ, Harbrow D, Taverne AAR, Symons AL. Orthodontic tooth movement in the prednisolone-treated rat. *Angle Orthod.* 2000 Apr;70(2):118-25.
 40. Yamane A, Fukui T, Chiba M. In vitro measurement of orthodontic tooth movement in rats given beta-aminopropionitrile or hydrocortisone using a time-lapse videotape recorder. *Eur J Orthod.* 1997 Feb;19(1):21-8.
 41. Pharoah MJ, Heersche JN. Dexamethasone inhibits formation of osteoclast-like cells in bone-marrow cultures. *J Dent Res.* 1986 Jul;65(7):1006-9.
 42. Hofbauer LC, Gori F, Riggs L, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg CT, Khosla S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells potential paracrine mechanisms of glucocorticoid induced osteoporosis. *Endocrinology.* 1999 Oct;140(10):4382-9.
 43. Vandeyska-Radunovic V, Kristiansen AB, Heyeraas KJ, Kvinnsland S. Changes in blood circulation in teeth and supporting tissues incident to experimental tooth movement. *Eur J Orthod.* 1994 Oct;16(5):361-9.
 44. Brodin P, Linge L, Aars H. Instant assessment of pulpal blood flow after orthodontic force application. *J Orofacc Orthop.* 1996 Oct;57(5):306-9.

45. Tani-Ishii N, Wang CY, Stashenko P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol.* 1995 Aug;10(4):213-9.
46. Sastre J, Le Gall M. Tooth movement - clinical implications. *Int Orthod.* 2010 Jun;8(2):105-23.

FIGURAS

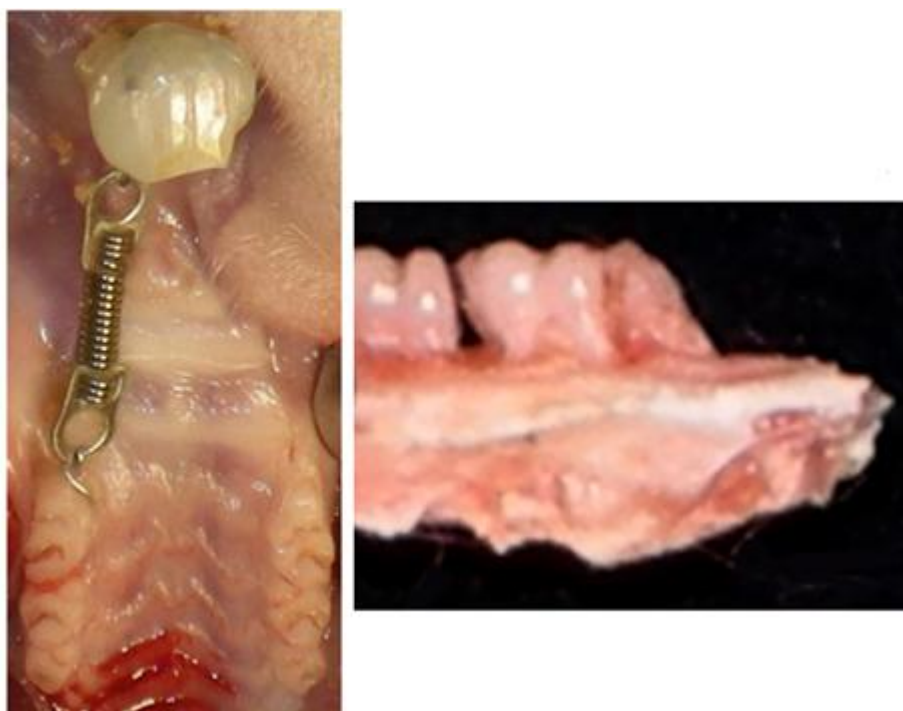


Fig. 1. Aparelho usado para mover o primeiro molar superior para mesial.

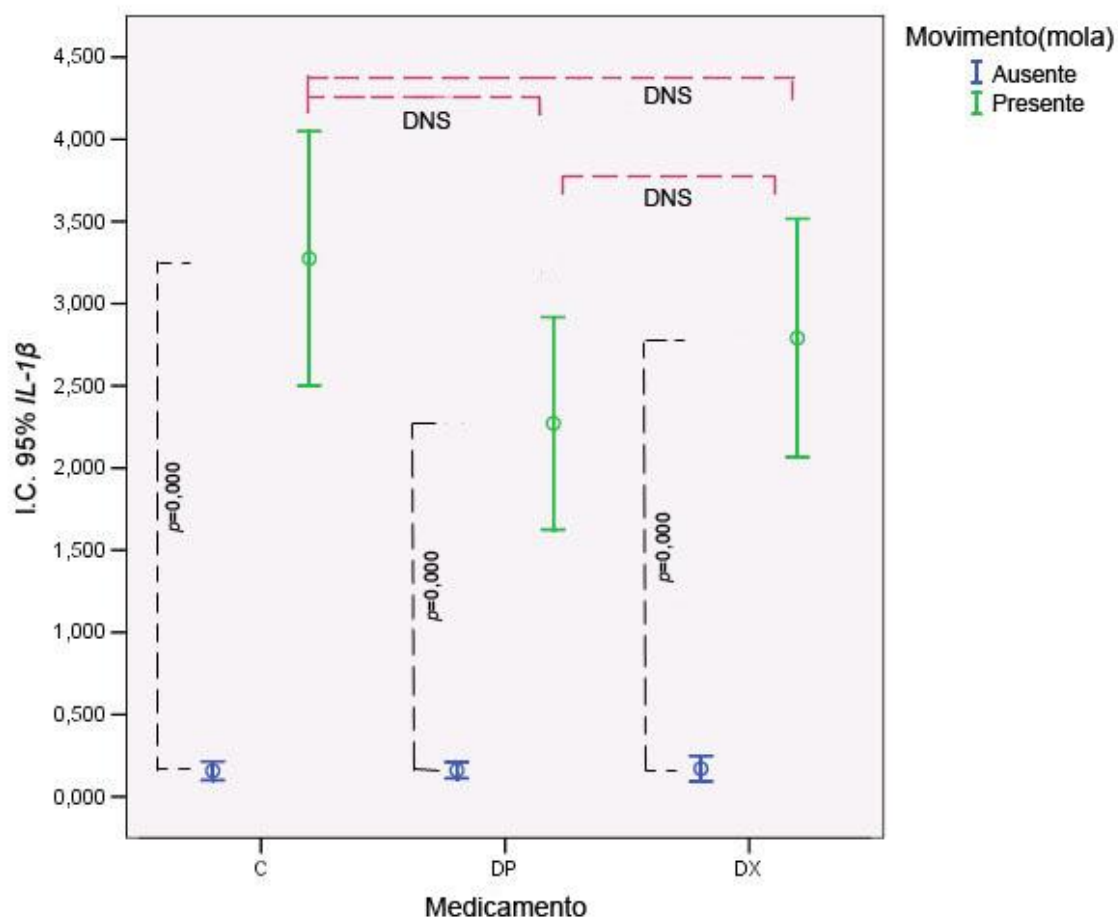


Fig. 2. Expressão quantitativa de IL-1 β analisada nos grupos com e sem mola, estratificada por uso de drogas, mas não por dias de tratamento. As linhas pretas indicam o valor de p nas comparações C vs CM, DP vs DPM e DX vs DXM em grupos com e sem mola. Linhas rosas segmentadas indicam diferenças não estatisticamente significativas (DNS) entre os grupos com mola.

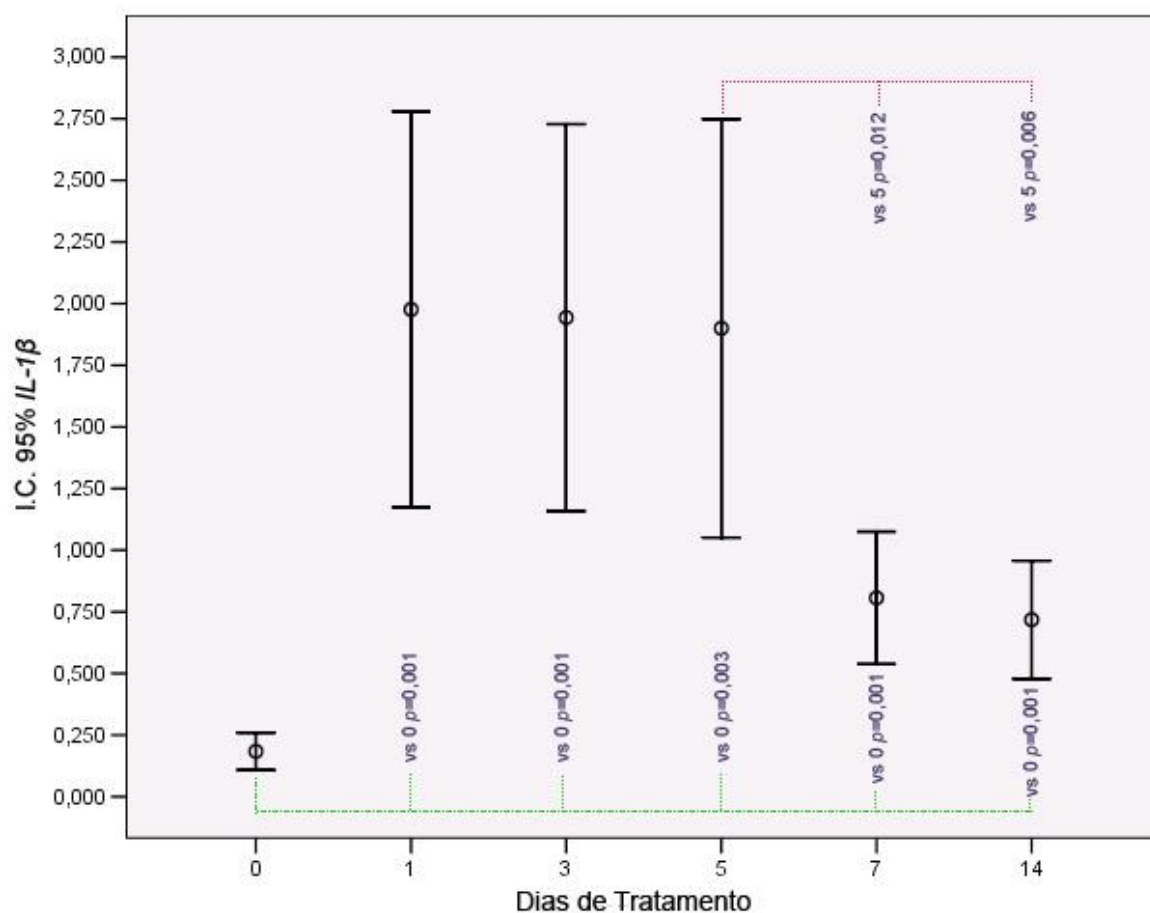


Fig. 3. A expressão quantitativa de IL-1 β analisada nos grupos com dias de tratamento, sem estar estratificada por uso de mola ou por uso de drogas. As linhas verdes pontilhadas indicam o valor de p comparando dia 0 vs (1, 3, 5, 7 e 14) e as linhas rosas pontilhadas indicam o valor de p comparando o dia 5 vs 7 e comparando o dia 5 vs 14.

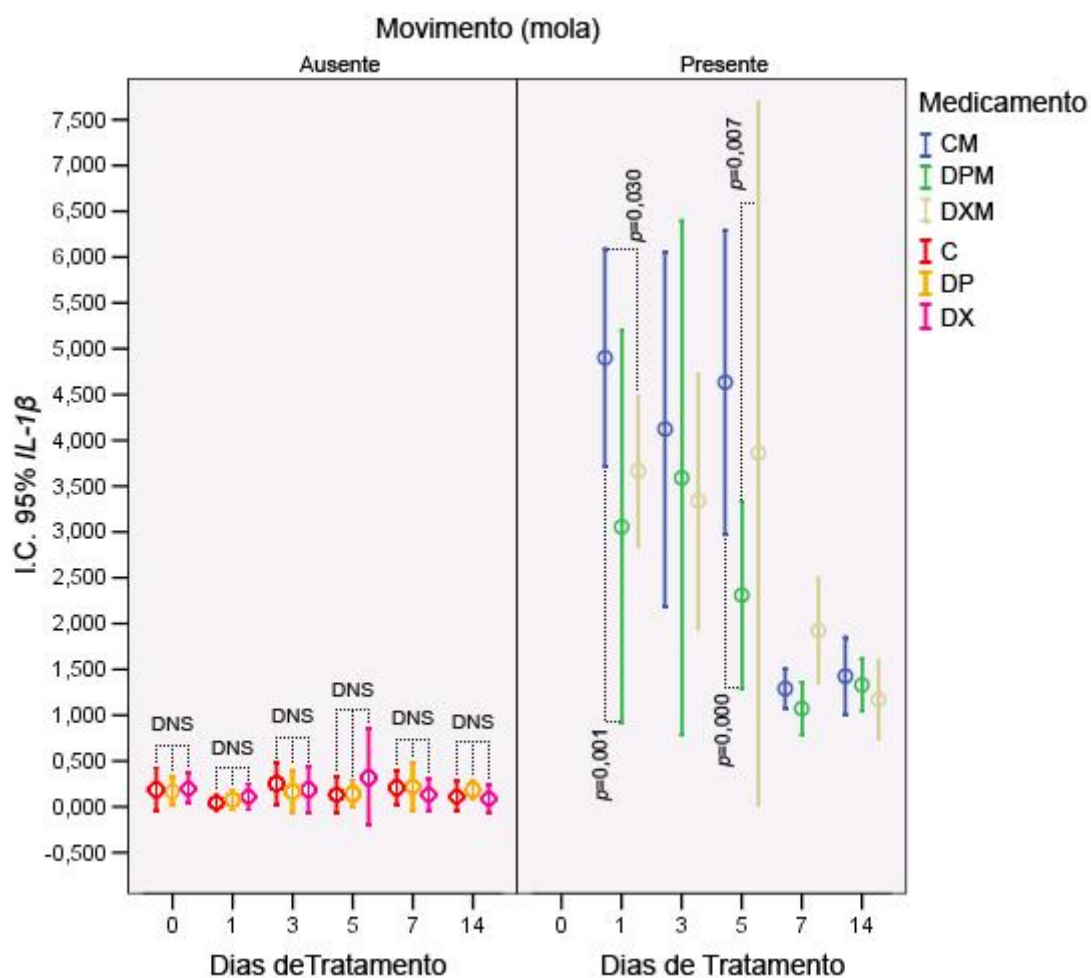


Fig. 4. A expressão quantitativa de IL-1 β estratificada por mola, drogas e dias de tratamento foi analisada. DNS observou-se entre os grupos sem movimento: C, DP e DX. As linhas pontilhadas indicam o valor de p comparando DPM com CM, DXM com CM no dia 1; DPM vs CM e DPM vs DXM no dia 5.

2 ARTIGO EM INGLÊS

TITLE PAGE

**IL-1 β EXPRESSION IN THE PERIODONTUM OF RATS
UNDER DEXAMETHASONE AND DICLOFENAC ADMINISTRATION DURING
TOOTH MOVEMENT**

ABSTRACT

Introduction: Induced tooth movement is accomplished by the application of forces to teeth, usually of small magnitude and long duration. Pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , play regulatory roles in the periodontal tissues remodeling during orthodontic tooth movement. Orthodontic patients may use anti-inflammatory drugs to outcome chronic or acute diseases, which could affect IL-1 β expression, and in turn orthodontic tooth movement. **Objective:** Was to analyze the levels of IL-1 β gene transcripts in the periodontum of rats at different stages of tooth movement under dexamethasone and diclofenac potassium treatment. **Methods:** Ninety (n=90) male Wistar rats were used, 50 cN force was applied with a closed nickel-titanium coil spring to move mesially the maxillary right first molars. Group 1 received daily doses of 0.9% saline solution (0.5 mg/kg), group 2 received daily doses of diclofenac potassium (5 mg/kg) and group 3 received daily doses of dexamethasone (0.5 mg/kg). IL-1 β gene transcription levels were evaluated by Real-time PCR and compared between groups by ANOVA, $p < 0.05$. **Results:** It was found that mechanical stress induced the increase of IL-1 β transcription at each treatment time. Diclofenac potassium and dexamethasone induced significant reduction of expression at day 1 but only diclofenac potassium was able to reduce levels of gene transcripts at day 5. At days 7 and 14, no difference was observed compared with the controls. **Conclusion:** The present study showed evidence that mechanical forces induce the increase of IL-1 β expression in the periodontal tissues of rats. Moreover, anti-inflammatory drugs, such as diclofenac potassium and dexamethasone, were able to reduce such levels at the initial phases of tooth movement.

Keywords: Interleukin-1, Tooth movement, Anti-Inflammatory Agents

INTRODUCTION

Induced tooth movement is accomplished by the application of forces to teeth, usually of small magnitude and long duration.¹ An acute inflammatory response is initiated at the early phase of induced tooth movement, characterized by periodontal vasodilatation and migration of leucocytes out of the capillaries. These migratory cells produce numerous substances, including prostaglandins, growth factors, and cytokines.² At the cellular level, remodeling of the periodontum consists of bone resorption adjacent to the periodontal ligament (PDL) in the compression zone, bone apposition in the tension zone, and degeneration and re-establishment of the PDL.³ As a result, tooth movement takes place.⁴ Then, various cytokines and hormones play an important role in this process.⁵ Cytokines that were found to affect bone metabolism, and thereby induced tooth movement, include interleukin (IL) as, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and gamma interferon (IFN- γ).¹ Both IL-1 α and IL-1 β are more potent in stimulating bone resorption than the TNF- α .⁶

IL-1 β is one of the first cytokines described, inducing the expression of a variety of genes and the synthesis of several proteins.⁷ It is a key mediator in acute-phase inflammatory reactions,⁸ expressed in large quantities by macrophages,⁹ fibroblasts,⁷ and osteoclasts.¹⁰ This pro-inflammatory cytokine is a member of the formerly known osteoclast-activating factor (OAF) and has been implicated in the bone remodeling process. IL-1 β acts in an autocrine/paracrine manner to regulate the expression of transcription factors, cytokines, growth regulatory molecules, and enzymes involved in the differentiation and function of mesenchymal and other cell types.⁴

The incidence and prevalence of many chronic conditions (asthma, diabetes, elevated cholesterol and arthritis, for example) have increased in recent years, in part because the population is aging but also, in some cases, because it is less healthy. In this context, more and more doctors are treating chronic illnesses with drugs.¹¹ Some drugs affect tooth movement; for instance, those which interfere with arachidonic acid cascade, such as steroidal anti-inflammatory (SAID) and nonsteroidal anti-inflammatory (NSAID) drugs, may inhibit the tooth movement, diminish the number of osteoclasts, probably by inhibiting the prostaglandins¹² and,

at the same time, interfere with bone matrix formation, reducing collagen organization and maturation in the initial phases of tooth movement.¹³ Then, it is critical to know what medications an orthodontic patient is using or will use.¹⁴

Since an increasing number of people require orthodontic treatment and, at the same time, use medications such as SAID and NSAID to treat chronic or acute diseases, there is a need for studies on the effects of various medications on orthodontic tooth movement, especially in animal models.¹⁵ Thus, the aim of this study was to analyze the levels of IL-1 β gene transcripts in the periodontum of rats submitted to induced tooth movement at different times under dexamethasone and diclofenac potassium treatment.

MATERIAL AND METHODS

Orthodontic movement induced

Ninety (n=90) 3-month male Wistar rats (average weight of 350 g) were housed in polycarbonate cages (three rats per cage) under a standard 12/12-h light/dark cycle at temperatures between 19°C and 22°C. All animals were fed a powdered diet to prevent fracture in orthodontic apparatus with tape water *ad libitum* during the experimental period. The study was conducted under approval from the Ethical Committee for Animal Use at Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR), approved under protocol CEUA-PUCPR nº 507.

The orthodontic movement was produced by a nickel-titanium (NiTi) closed-coil spring (3M Unitek, ref. 344-150, California, USA), that applied a force of 50 cN magnitude (16, 17, 27) to move mesially the maxillary first right molars (Fig. 1). The force was measured using a Dynamometer gauge (Dentaurum, number 1005004, Ispringen, Deutschland). The coil spring was set while the animal was sedated by intramuscular injection of 1.8 mg/kg ketamine (Vetanarcol®, König, Avellaneda, Argentina) and 1.1 mg/kg xylazine (Rompun®, Bayer, São Paulo, Brazil).

The maxillary right first molars of all rats received the orthodontic appliance and were divided into groups: CM (control with orthodontic movement), DPM (diclofenac potassium with orthodontic movement), and DXM (dexamethasone with orthodontic movement). There was no reactivation during the experimental period. The left first molars were not given any force and served as the contralateral control side, according to Bletsa et al. (2006) and Lee et al. (2009), and were divided into groups C (control, without orthodontic movement), DP (diclofenac potassium control without orthodontic movement), and DX (dexamethasone control without orthodontic movement). Each of the experimental groups was subdivided into 0, 1, 3, 5, 7, and 14 days of tooth movement (5 rats per subgroup).

The animals in the C and CM groups received daily doses of 0.9% (5mg/kg) saline solution to simulate injection stress, starting five days before the coil spring installation. In the DP and DPM groups, the rats received daily doses (5 mg/kg) of diclofenac potassium (Cataflam®, Lab. Novartis Biociências, São Paulo-SP, Brazil) by intramuscular injection, starting five days before the coil spring installation.^{13,20} Finally, the DX and DXM groups received daily doses (0.5 mg/kg) of dexamethasone

(Decadron®, Achè Lab S.A., Guarulhos-SP, Brazil) intramuscularly, also starting five days before the orthodontic appliance insertion.^{21,22}

Groups of rats were euthanized with an overdose of anesthetic (Ketamine, 5.4 ml/kg) at 0, 1, 3, 5, 7, and 14 days after the coil spring installation. The maxilla was immediately dissected free and the adherent soft tissues were removed. The left and right first upper molars, including its surrounding periodontium (PDL and alveolar bone), were cut as a block carefully, all the same size.

Real Time polymerase chain reaction (PCR)

The extraction of total RNA from dental and periodontal tissues (comprising alveolar bone, periodontal ligament, and cementum) was performed using Trizol® Reagent (Invitrogen, California, USA) reagent, following the protocol recommended by the manufacturer. Briefly, the block was crushed in a porcelain mortar and pestle for 30 s and Trizol (1 ml to 1 mg of tissue) was added to the sample. For each 1 ml of the suspension, 0.2 ml chloroform (Sigma Co., St. Louis, MO) was added and centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C. The aqueous phase was transferred to a new tube, to which the same volume of isopropanol was also added. The sample was shaken, incubated for 20 min at 20°C and centrifuged again as previously described. The precipitate was washed in 75% ethanol and dried at room temperature. RNA samples were suspended in 40 µl of deionized RNase free water (DEPC) one µl was used to obtain the concentration of RNA/µl in the samples. The complementary DNA (cDNA) was synthesized using 3 µg of RNA through a reverse transcription reaction (Superscript III; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), as previously described.²³ Real-time polymerase chain reaction (PCR) quantitative messenger RNA (mRNA) analyses were performed in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System using the SybrGreen system (Applied Biosystems, Warrington, UK). SybrGreen PCR MasterMix (Applied Biosystems), 100 nM specific primers, and 2.5 ng of cDNA (or 5 ng of DNA) were used in each reaction.

The primer sequences, the predicted amplicon sizes, and the annealing and melting temperatures, designed using the Primerexpress software (Applied Biosystems). The standard PCR conditions were 95°C (10 min), followed by 40 cycles of 94°C (1 min), 56°C (1 min), and 72°C (2 min), and by the standard denaturation curve. For mRNA analysis, the relative level of gene expression was

calculated in reference to beta-actin expression in the sample, using the cycle threshold (Ct) method.

For DNA analysis, gene expression levels were determined using the Ct method. Negative controls without cDNA, and without reverse transcriptase, were also performed. One representative experiment of three is presented in the results.

Statistical analysis

Data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences 18.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA) and Statistic 8 (Statsoft, Inc. Tulsa, OK, EUA). ANOVA test was used to compare differences in the mean values of the variable IL-1 β transcript levels between the groups C, DP, DX, presence or absence of coil spring producing orthodontic tooth movement (absent, present), and time (days 0, 1, 3, 5, 7, and 14). To verify homogeneity, Levene test was used. Games-Howell test was used to identify intergroup differences, with a significance level of 0.05.

RESULTS

In the same way, when the IL-1 β expression was analyzed in the groups stratified by coil spring presence and by drug use, but not for days of treatment, it was found that the levels of IL-1 β transcripts were increased in the CM compared with C ($p=0.000$), DPM compared with DP ($p=0.000$) and in the DXM compared with DX ($p=0.000$) (Fig. 2). Considering the use of NSAID and SAID drugs, it was observed no statistically significant difference (NSD) between C and DP ($p=0.372$), C and DX ($p=0.825$), and between DP and DX ($p=0.720$) (Fig. 2).

When IL-1 β expression was compared according to days of treatment, no stratified by presence or absence of coil spring and drug administration, it was found that the transcript levels were increased on days 1 ($p=0.001$), 3 ($p=0.001$), 5 ($p=0.003$), 7 ($p=0.001$) and 14 ($p=0.001$) in relation to day zero. There was a similar expression at days 1, 3, 5. However, at day 7, the levels of expression started to decrease considerably compared with day 5 ($p=0.012$) and it remained low at day 14 with moderate decrease ($p=0.006$) (Fig. 3).

When the samples were stratified by the three variables: i) coil spring presence or absence, ii) drugs use, and iii) time of treatment, IL-1 β expression showed SSD between groups with and without coil spring at each treatment time ($p<0.05$). Compared the three variables between the groups under tooth movement, it was found an IL-1 β expression decreased on DPM compared with CM ($p=0.001$) and DXM compared with CM ($p=0.030$) at the day 1; furthermore, NSD was found between DPM and DXM. NSD was found between CM, DPM and DXM at day 3. Nevertheless, it was found SSD in DPM vs CM ($p=0.000$) and DPM vs DXM ($p=0.007$) at day 5. At 7 and 14 days, NSD was found between CM, DPM and DXM (Fig. 4). While DPM started to decrease at day 5 compared with at day 3 ($p=0.000$), DXM started to decrease at day 7 ($p=0.001$) compared with day 5 (Fig. 4). However, in the groups which did not receive the drugs, IL-1 β expression decreased from day 7 on (Fig. 4).

DISCUSSION

Orthodontic tooth movement directly depends on changes occurring at periodontal ligament, a highly vascularized and cellularized connective tissue that attaches tooth root to the surrounding alveolar bone.²⁴ The complex process that involves bone remodeling is affected by pro-inflammatory cytokines, for instance IL-1 β .¹ Some drugs such as SAIDs and NSAIDs, may influence tooth movement; thus, orthodontists should be aware of this drug interaction.¹⁴ To investigate the changes in the IL-1 β expression during periodontal remodeling due to tooth movement under NSAID and SAID, periodontal tissues of rats under induced orthodontic tooth movement were studied.

Many studies on tooth movement have been carried out in experimental model, particularly with rats,^{13,16-17,19} which remains the model of choice despite some anatomical and physiological shortcomings.²⁵ The maxillary right first molars of all rats received the orthodontic appliance and the left first molars were not given any force and served as the contralateral control side as shown in previous studies.^{18,26}

It was proposed that IL-1 β , produced locally by mechanically activated cells, is responsible for mediating both the resorptive and formative phases of connective tissue remodeling.^{1,28} The immunolocalization of IL-1 β in the periodontal tissues of cat canine teeth following the application of a tipping force provided the first experimental evidence in support of this hypothesis.²⁹ Posterior experimental studies^{19,30} and clinical studies in gingival crevicular fluid (GCF) have shown that IL-1 β is elevated during orthodontic tooth movement.³¹⁻³³ In accordance with previous studies, our results showed that mechanical forces, coil spring side presence, induced increased expression of IL-1 β in all days of treatment, but not in the contralateral side.

At early phases of appliance activation, IL-1 β levels at control and experimental teeth showed a significant increase at 24 h.³¹⁻³⁴ Maximal cytokine levels were detected on day 3 after the application of orthodontic force,³⁴⁻³⁵ reducing within 7 days.³¹⁻³⁴ Then, they dropped to baseline by 14-28 days.³⁵ In our findings, it was also observed that levels of IL-1 β gene transcripts were increased at days 1, 3, 5, and decreased significantly at day 7, remaining low on day 14, even considering groups with/without spring coil and with/without drugs use. The coil spring did not

require reactivation during the experiment. This fact may explain the reason that IL-1 β levels were decreased from day 7.³⁴

Our study shows that IL-1 β expression under orthodontic tooth movement decreased significantly at day 1 in groups using diclofenac and dexamethasone, and at day 5 in groups using diclofenac. At day 5, diclofenac reduced significantly more the levels of IL-1 β than dexamethasone. However, the lack of significance of group with dexamethasone in relation the control group may be due to the high spectrum of variance in the expression observed in the dexamethasone group. The expression with the use of drugs did not differ between groups which did not receive the coil spring (Fig. 4).

IL-1 β levels increased rapidly in the GCF in humans and the PGE production peaked later (24 to 48 hours), suggesting that IL-1 β may enhance PGE production in mechanically stressed periodontal ligament.³⁰⁻³¹ Cyclooxygenase inhibition resulted in exacerbation of IL-1 β mediated collagenase production and activity, as well as attenuation of type IV procollagen synthesis levels by endothelial cells in vitro.³⁶ NSAID suppression of bone ingrowths may be due to cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition or through unidentified pathways.³⁷ It was shown in rats, that both inhibitors selective COX-2 rofecoxib and nonspecific COX diclofenac were effective to inhibiting dental movement.^{16,38} Also, diclofenac reduced the number of osteoblasts at early stages of bone healing.²⁰

Studies show that the use of corticosteroids administered to mature male Wistar rats with an orthodontic appliance did not affect the magnitude of orthodontic tooth movement compared with the controls.³⁹ In contrast, it was reported that tooth movement in rats was inhibited by hydrocortisone.⁴⁰ Acute treatment with corticosteroid drug suppressed bone resorption and formation with mechanical stimulus, whereas chronic steroid treatment led to an increased biological reaction to mechanical perturbation indicating that the orthodontic force level should be reduced and controlled more frequently in patients under chronic steroid treatment.²⁶ The effect of corticosteroids on bone components remains to be elucidated. It was suggest that dexamethasone inhibits the production of osteoclasts.⁴¹ However, controversy exists as to the effects of corticosteroids on tooth movement. It was also suggested that dexamethasone increases osteoclastogenesis and stimulates bone resorption.⁴²

One of the limitations of this study is the inclusion of dental more than only periodontal tissues (alveolar bone, ligament and cement), which would be the hotspot structure where the remodeling phenomenon takes place. Although orthodontic movement may affect the dental pulp, inducing vascular changes,⁴³⁻⁴⁴ the expression of IL-1 β in pulpal tissues may be not affected, as shown in a study investigating periapical lesions, which represents an inflammatory condition.⁴⁵

This study showed an increase in the levels of IL-1 β gene transcripts in groups under induced tooth movement and a decrease in groups under drugs use at day 1 and 5. As previously mentioned, IL-1 β enhances prostaglandin production and induces alveolar bone and PDL remodeling during tooth movement prior to the production of new extracellular matrix.²⁴ Thus, tooth movement can be modified by the patient's medical context or by the medication prescribed.⁴⁶ Although the extrapolation from the rat response to the patient must be complex, the orthodontist should identify these patients by carefully questioning them about their medication history. It is recommended that such an inquiry should be part of every orthodontic diagnosis and helpful to clinical practice.

CONCLUSION

The present study shows following evidence:

1. Induced tooth movement led to the increase of IL-1 β expression in the periodontal tissues of rats.
2. Induced tooth movement in rats under anti-inflammatory drugs use, such as diclofenac potassium and dexamethasone, inhibited IL-1 β expression at the inflammatory process during the initial phases of tooth movement.

REFERENCES

1. Davidovitch Z. Tooth Movement. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1991;2(4):411-50.
2. Krishnana V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006 Apr;129(4):469.e1-32.
3. Thilander B, Rygh P, Reitan K. Tissue reactions in orthodontics. In: Graber T, Varnarsdall R. *Orthodontics. Current principles and techniques*. 3rd eds. St Louis, MO: Mosby; 2000.117-92.
4. Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod*. 2006 Jun;28(3):221-40. Epub 2006 May 10.
5. Sandy JR, Farndale RW, Meikle MC. Recent advances in understanding mechanically induced bone remodeling and their relevance to orthodontic theory and practice. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1993 Mar;103(3):212–22.
6. Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RL, J, Ago JM. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol*. 1987 Mar;138(5):1464-8.
7. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*. 1991 Apr;77(8):1627-52.
8. Dewhirst FE, Stashenko PP, Mole JE, Tsurumachi T. Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1 beta. *J Immunol*. 1985 Oct;135(4):2562-8.
9. Del Pozo V, De Andres B, Martin E, Maruri N, Zubeldia JM, Palomino P, Lahoz C. Murine eosinophils and IL-1: alpha IL-1 mRNA detection by in situ hybridization. Production and release of IL-1 from peritoneal eosinophils. *J Immunol*. 1990 Apr;144(8) 3117-22.

10. Uy HL, Dallas M, Calland JW, Boyce BF, Mundy GR, Roodman GD. Use of an In Vivo Model to Determine the Effects of Interleukin-1 on Cells at Different Stages in the Osteoclast Lineage. *J Bone Miner Res.* 1995 Feb;10(2):295-301.
11. Findlay S, Sherman D, Chockley N, Watkins S. Prescription drug expenditures in 2001: Another year of escalating costs. The National Institute for Health Care Management Research and Educational Foundation. 2002 May. 1-19.
12. Arias OR, Marquez-Orozco MC. Aspirin, acetaminophen, and ibuprofen: Their effects on orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006 Sep;130(3):364-70.
13. Retamoso LB, Montagner F, Camargo ES, Vitral RW, Tanaka OM. Polarized light microscopic analysis of bone formation after inhibition of cyclooxygenase 1 and 2. *Anat Rec (Hoboken).* 2010 Feb;293(2):195-9.
14. Schwartz JE. Ask Us: Some drugs affect tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2005 Jun;127(6):644.
15. Bartzela T, Türp JC, Motschall E, Maltha JC. Medication effects on the rate of orthodontic tooth movement: A systematic literature review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009 Jan;135(1):16-26.
16. Gameiro GH, Nouer DF, Pereira Neto JS, Siqueira VC, Andrade ED, Novaes PD, et al. Effects of Short and Long Term Celecoxib on Orthodontic Tooth Movement. *Angle Orthodontist.* 2008 Sept;78(5):860-5.
17. Gonzales C, Hotokezaka H, Matsuo KI, Shibazaki T, Yozgatian JH, Darendeliler MA, et al. Effects of Steroidal and Nonsteroidal Drugs on Tooth Movement and Root Resorption in the Rat Molar. *Angle Orthod.* 2009 Jul;79(4):715-26.
18. Bletsa A, Berggreen E, Brudvik P. Interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha expression during the early phases of orthodontic tooth movement in rats. *Eur J Oral Sci.* 2006 Oct;114(5): 423-9

19. Lee TY, Lee KJ, Baik HS. Expression of IL-1 β , MMP-9 and TIMP-1 on the pressure side of gingiva under orthodontic loading. *Angle Orthod.* 2009 Jul;79(4):733-9.
20. Krischak GD, Augat P, Blakytyn R, Claes L, Kinzl L, Beck A. The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac reduces appearance of osteoblasts in bone defect healing in rats. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2007 Aug;127(6):453-8.
21. Omoigui S. *The pain drugs handbook.* St. Louis: Mosby; 1995. 603p.
22. Allen DG, Pringle JK, Smith DA. *Handbook of Veterinary Drugs.* 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. 866p.
23. Cardoso CR, Garlet GP, Moreira AP, Junior WM, Rossi MA, Silva JS. Characterization of CD4⁺ CD25⁺ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis. *J Leukoc Biol.* 2008 Jul; 84(1): 311-8.
24. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res.* 2002 Feb;17(2):210-20.
25. Ren Y, Jaap C, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. The rat as a model for orthodontic tooth movement-a critical review and a proposed solution. *Eur J Orthod.* 2004 Oct;26(5):483-90.
26. Kalia S, Melsen B, Verna C. Tissue reaction to orthodontic tooth movement in acute and chronic corticosteroid treatment. *Orthod Craniofac Res.* 2004 Feb; 7(1):26-34.
27. King GJ, Keeling SD. Orthodontic bone remodeling in relation to appliance decay. *Angle Orthod.* 1995 Apr;65(2):129-40.
28. Meikle MC, Heath JK, Atkinson SJ, Hembry RM, Reynolds JJ. Molecular biology of stressed connective tissues at sutures and hard tissues in vitro. In:

- Norton LA, Burstone CJ. The biology of tooth movement. Boca Raton: CRC Press; 1989. p.71-86
29. Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL. Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dent Clin North Am.* 1988 Jul;32(3):411-35.
 30. Saito M, Saito S, Ngan PW, Shanfeld J, Davidovitch Z. Interleukin 1 beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1991 Mar; 99(3):226-40.
 31. Grieve III WG, Johnson GK, Moore RN, Reinhardt RA, Dubois LM. Prostaglandin E (PGE) and interleukin-IL1 β (IL-1 β) levels in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1994 Apr;105(4):369-74.
 32. Uematsu S, Mogil M, Deguchi T. Interleukin (IL)-1, IL-6, Tumor Necrosis Factor- α , Epidermal Growth Factor, and 2-Microglobulin Levels Are Elevated in Gingival Crevicular Fluid during Human Orthodontic Tooth Movement. *J Dent Res.* 1996 Jan;75(1):562-7.
 33. Lee KJ, Park YC, Yu HS, Choi SH, Yoo YJ. Effects of continuous and interrupted orthodontic force on interleukin-1 β and prostaglandin E2 production in gingival crevicular fluid. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004 Feb;125(2):168-77.
 34. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiat M. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001 Mar;119(3):307-12.
 35. Iwasaki LR, Haack JE, Nickel JC, Reinhardt RA, Petro TM. Human interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist secretion and velocity of tooth movement. *Arch Oral Biol.* 2001 Feb;46(2):185-9.
 36. Kyrkanides S, O'Banion MK, Subtelny JD. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in orthodontic tooth movement: metalloproteinase activity and collagen

- synthesis by endothelial cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2000 Aug;118(2):203-9.
37. Goodman S, Ma T, Trindade M, Ikenoue T, Matsuura I, Wong N, et al. COX-2 selective NSAID decreases bone ingrowth in vivo. *J Orthop Res.* 2002 Nov;20(6):1164-9.
 38. De Carlos F, Cobo J, Díaz-Esnal B, Arguelles J, Vijande M, Costales M. Orthodontic tooth movement after inhibition of cyclooxygenase-2. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006 Mar;129(3):402-6.
 39. Ong CKL, Walsh LJ, Harbrow D, Taverne AAR, Symons AL. Orthodontic tooth movement in the prednisolone-treated rat. *Angle Orthod.* 2000 Apr;70(2):118-25.
 40. Yamane A, Fukui T, Chiba M. In vitro measurement of orthodontic tooth movement in rats given beta-aminopropionitrile or hydrocortisone using a time-lapse videotape recorder. *Eur J Orthod.* 1997 Feb;19(1):21-8.
 41. Pharoah MJ, Heersche JN. Dexamethasone inhibits formation of osteoclast-like cells in bone-marrow cultures. *J Dent Res.* 1986 Jul;65(7):1006-9.
 42. Hofbauer LC, Gori F, Riggs L, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg CT, Khosla S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells potential paracrine mechanisms of glucocorticoid induced osteoporosis. *Endocrinology.* 1999 Oct;140(10):4382-9.
 43. Vandevska-Radunovic V, Kristiansen AB, Heyeraas KJ, Kvinnsland S. Changes in blood circulation in teeth and supporting tissues incident to experimental tooth movement. *Eur J Orthod.* 1994 Oct;16(5):361-9.
 44. Brodin P, Linge L, Aars H. Instant assessment of pulpal blood flow after orthodontic force application. *J Orolfac Orthop.* 1996 Oct;57(5):306-9.

45. Tani-Ishii N, Wang CY, Stashenko P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol.* 1995 Aug;10(4):213-9.
46. Sastre J, Le Gall M. Tooth movement - clinical implications. *Int Orthod.* 2010 Jun;8(2):105-23.

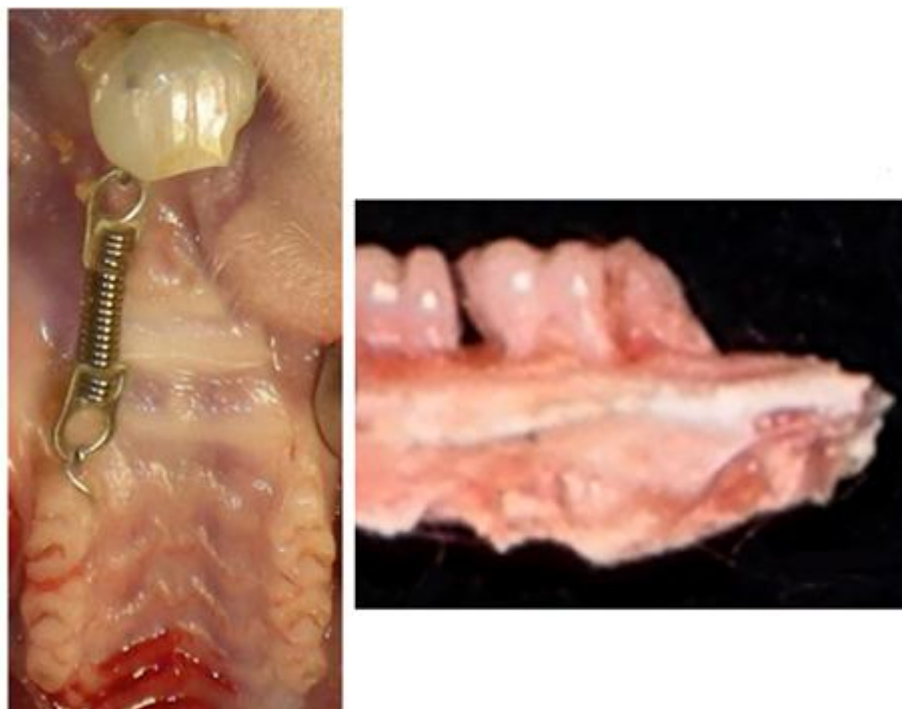
FIGURES

Fig. 1. Appliance used to move the maxillary first molars mesially.

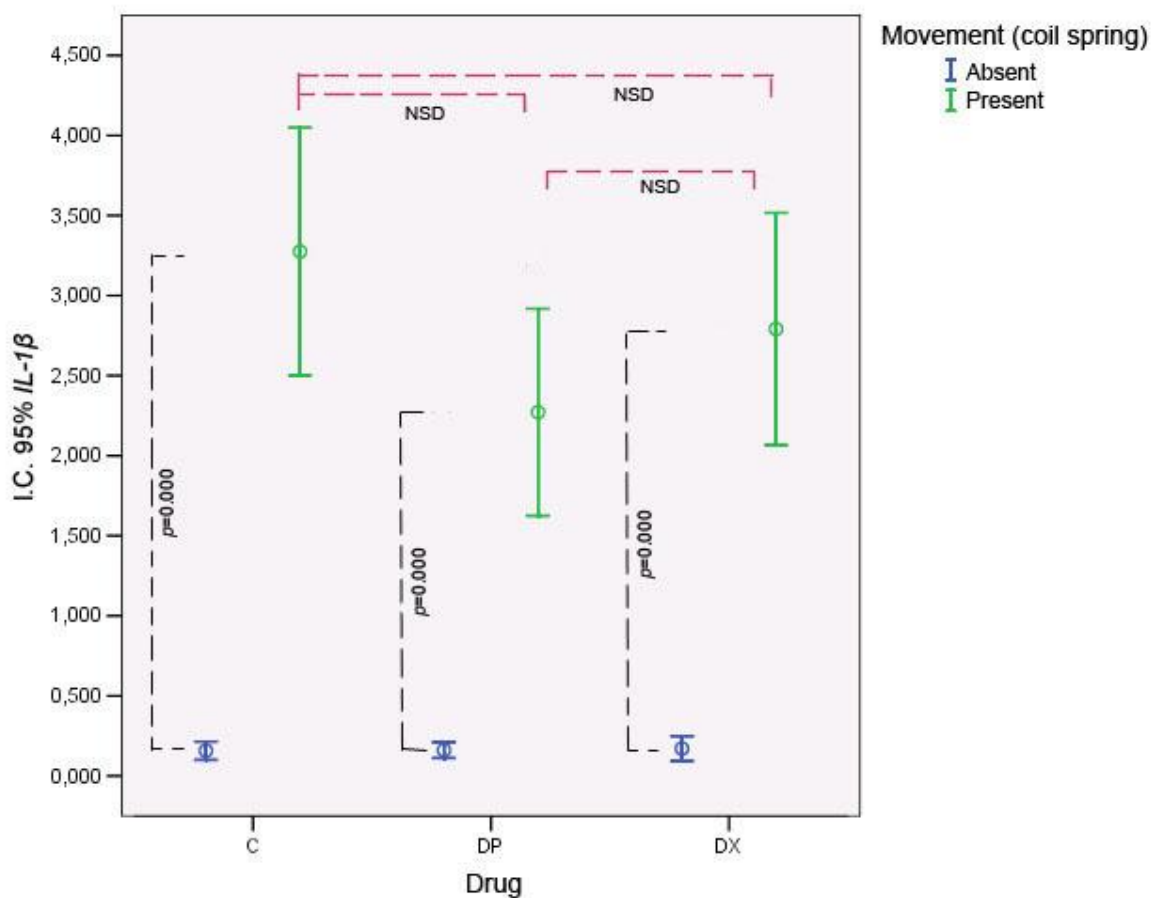


Fig. 2. Quantitative expression of IL-1 β analyzed in the groups with and without coil spring, stratified by drug use, but not by days of treatment. Black segmented lines indicate p value comparing C vs CM, DP vs DPM, and DX vs DXM in groups with and without coil spring. Pink segmented lines indicate no statistically significant differences (NSD) between groups with coil spring.

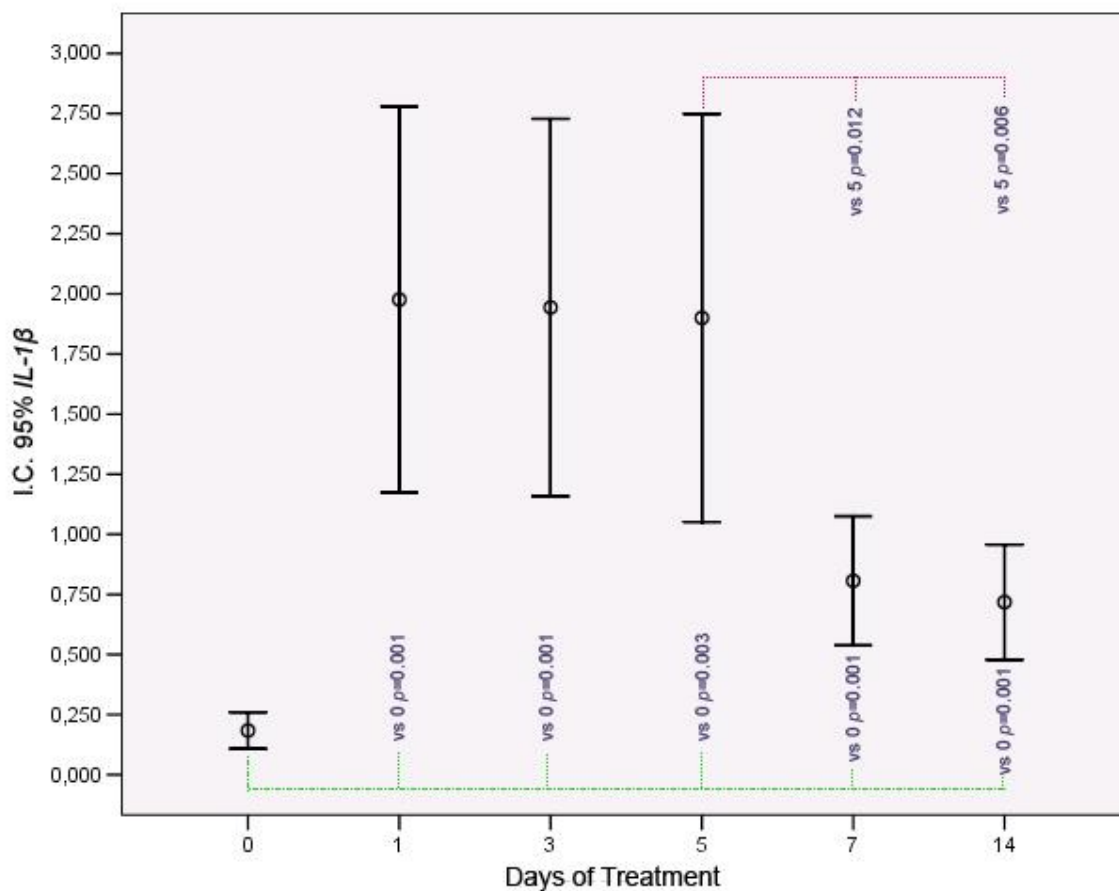


Fig. 3. Quantitative expression of IL-1 β analyzed in different days of treatment, not stratified by coil spring or drug use. Green dotted lines indicate p value comparing day 0 vs days 1, 3, 5, 7, and 14 and pink dotted lines indicate p value comparing day 5 vs day 7 and comparing day 5 vs 14.

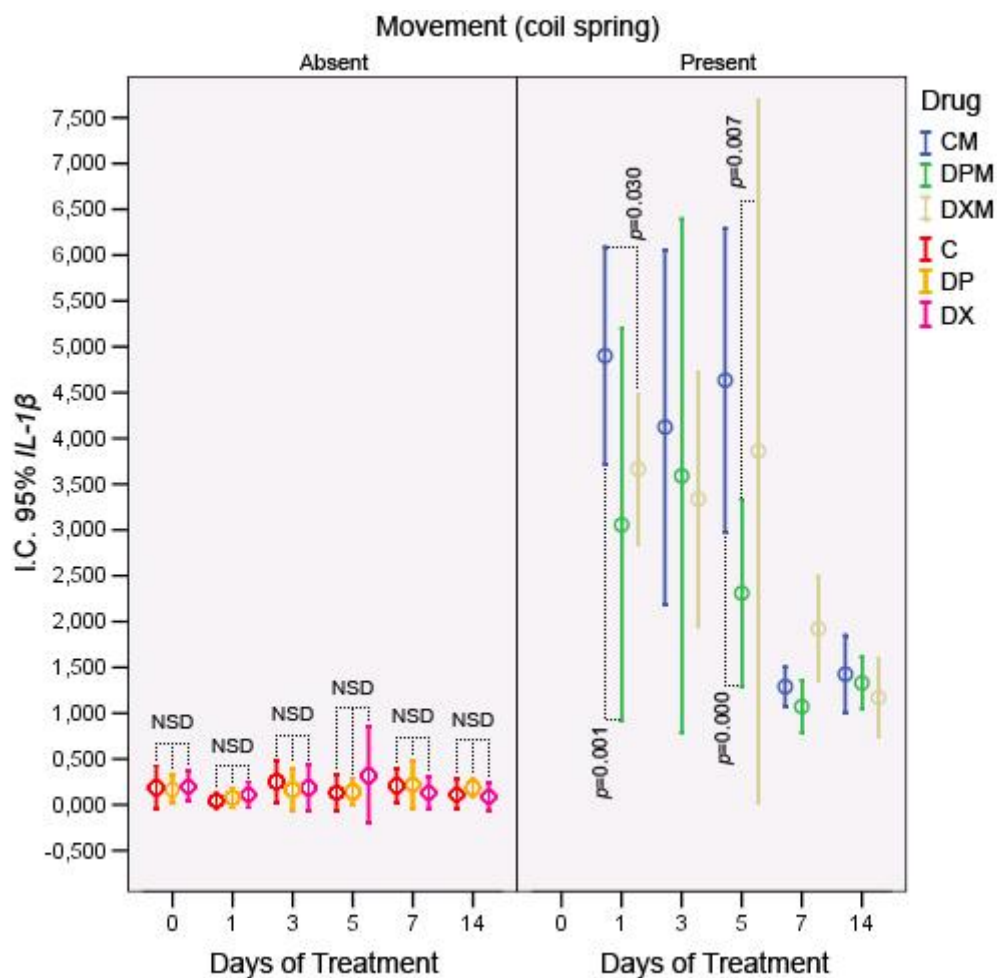


Fig. 4. Quantitative expression of IL-1 β in groups without and with coil spring stratified by drugs use and days of treatment was analyzed. Dotted lines indicate NSD between C, DP and DX in samples without coil and the p values comparing DPM with CM, DXM with CM at the day 1; DPM vs CM and DPM vs DXM at day 5.

ANEXO A - PARECER 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, 06 de maio de 2010.

REGISTRO DO PROJETO NO CEUA: 507 – 4ª versão

TÍTULO DO PROJETO:

Atuação de Fármacos sistêmicos no movimento dentário induzido em ratos

PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Orlando Motohiro

EQUIPE DA PESQUISA:

Orlando Motohiro Tanaka
Paula Cristina Trevilatto
Dolores Fátima Campos Navarro
Gabriela Pinto Molina da Silva

INSTITUIÇÃO:

PUCPR

CATEGORIA DO EXPERIMENTO – CATEGORIA D

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE E/OU PESO	QUANTIDADE
Wistar (<i>Rattus norvegicus albinus</i>)	Machos	9 semanas, 300 a 350 gr	120

O colegiado do CEUA em reunião no dia 29/04/2010, 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. Graziêla Maria D'Almeida e Oliveira
 Coordenadora
 Comitê de Ética no Uso de Animais - PUCPR

ANEXO B – ANÁLISE ESTATÍSTICA COMPLEMENTAR

ANNOVA para IL-1 β mRNA – Movimento (mola)

Movimento	N	Média	Desvio Padrão
Ausente	90	0,163	0,167
Presente	75	2,779	1,761

Fonte: Valores da Pesquisa

Nota: Valores de movimentos discriminando dados de Dias de Tratamento e Medicamento

Legenda: N → Quantidade de dados analisados

Teste de homogeneidade de variâncias para IL-1 β mRNA – Movimento (mola)

Statísticas de Levene	df1	df2	Sig.
181,578486	1	163	0,000

Fonte: Valores da Pesquisa

Nota: Valores de movimentos discriminando dados de Dias de Tratamento e Medicamento

Nota 2: Distribuição homogênea $p < 0,05$

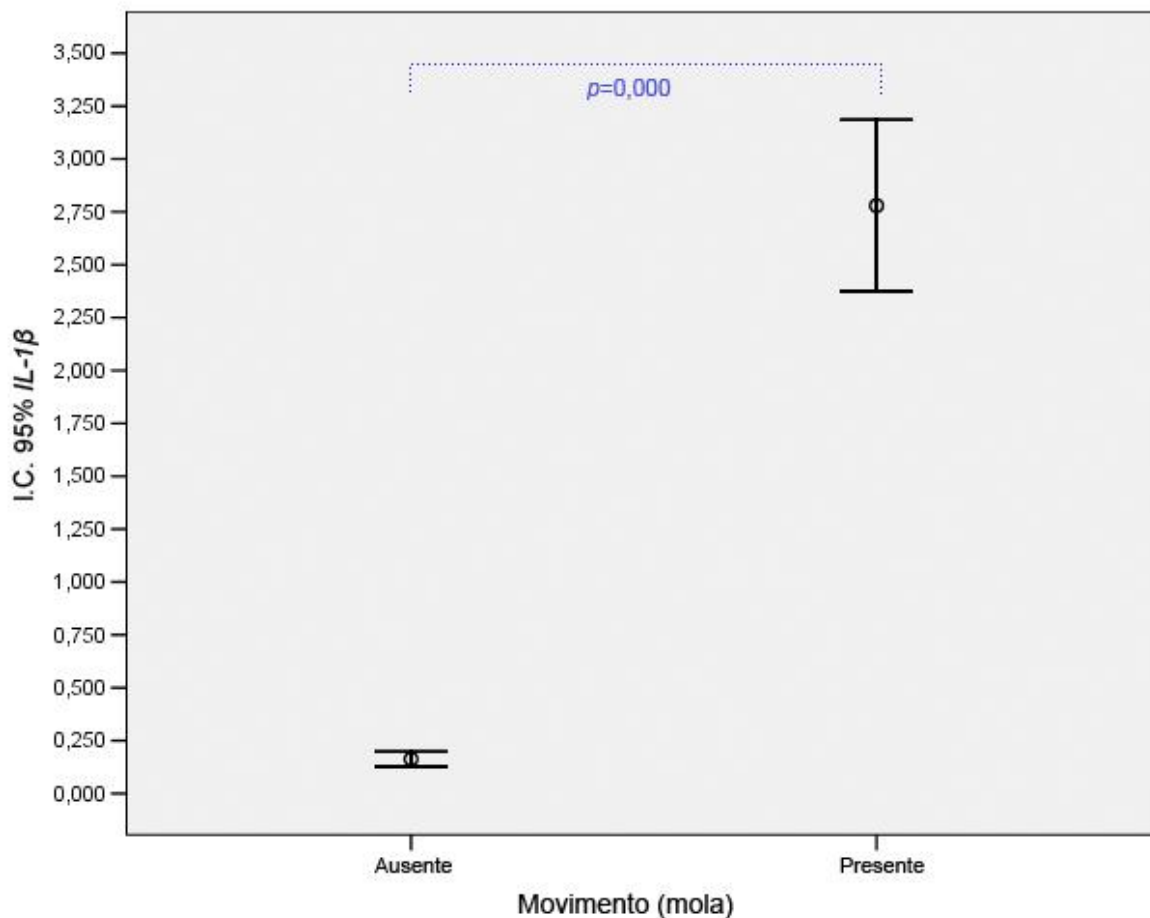
Teste de Between-Subjects Effects para IL-1 β mRNA – Movimento (mola)

Soma de quadrados do tipo III	df	Quadrado de Média	F	Sig.
257,4936	1	257,49	324,27	0,000

Fonte: Valores da Pesquisa

Nota: Valores de movimentos discriminando dados de Dias de Tratamento e Medicamento

Note 2: Calculado usando $p < 0,05$



ANNOVA para IL-1 β mRNA – Medicamento

Medicamento	N	Média	Desvio Padrão
C	55	1,574727	2,005432
DP	55	1,120364	1,491178
DX	55	1,361818	1,769533

Fonte: Valores da Pesquisa

Nota: Valores de medicamentos discriminando dados de Dias de Tratamento e Movimento

Legenda: N → Quantidade de dados analisados

Teste de homogeneidade de variâncias para IL-1 β mRNA – Medicamento

Statísticas de Levene	df1	df2	Sig.
3,68759	2	162	0,027157

Fonte: Valores da Pesquisa

Nota: Valores de medicamentos discriminando dados de Dias de Tratamento e Movimento

Nota 2: Distribuição homogênea $p < 0,05$

Teste de comparações múltiplas Games-Howell para IL-1 β mRNA - Medicamento

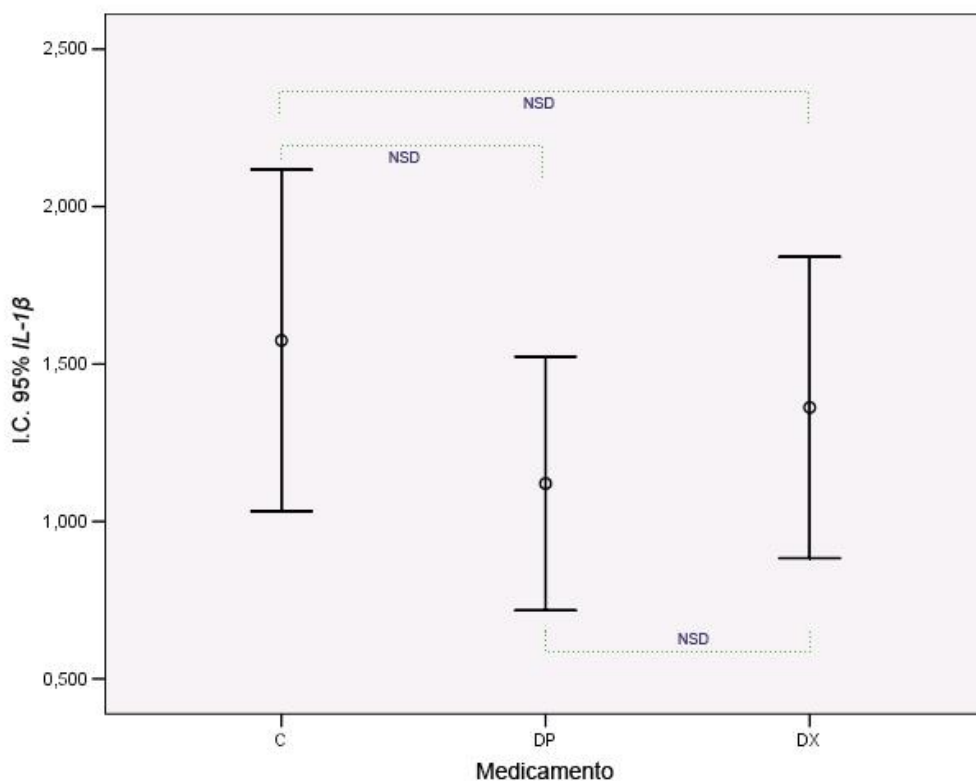
C	DP	DX	Diferença intergrupo
$\bar{x} \pm \sigma$	$\bar{x} \pm \sigma$	$\bar{x} \pm \sigma$	p
1,57 $\pm$ 2,00	1,20 $\pm$ 1,49	1,36 $\pm$ 1,77	DNS

Fonte: Valores da Pesquisa

Nota: Valores de medicamentos discriminando dados de Dias de Tratamento e Movimento

Nota 2: Calculado usando $p < 0,05$

Legendas: C → Grupo de Controle
 DP → Diclofenaco de Potássio
 DX → Dexametasona
 $\bar{x} \pm \sigma$ → Média $\pm$ Desvio Padrão



Teste de homogeneidade de variâncias para IL-1 β mRNA – Movimento (mola) e Medicamento

Statísticas de Levene	df1	df2	Sig.
31,64178836	5	159	0,000

Fonte: Valores da Pesquisa

Nota: Valores discriminando dados de Dias de Tratamento

Nota 2: Distribuição homogênea $p < 0,05$

Teste de comparações múltiplas Games-Howell para IL-1 β mRNA – Movimento (mola) e Medicamento

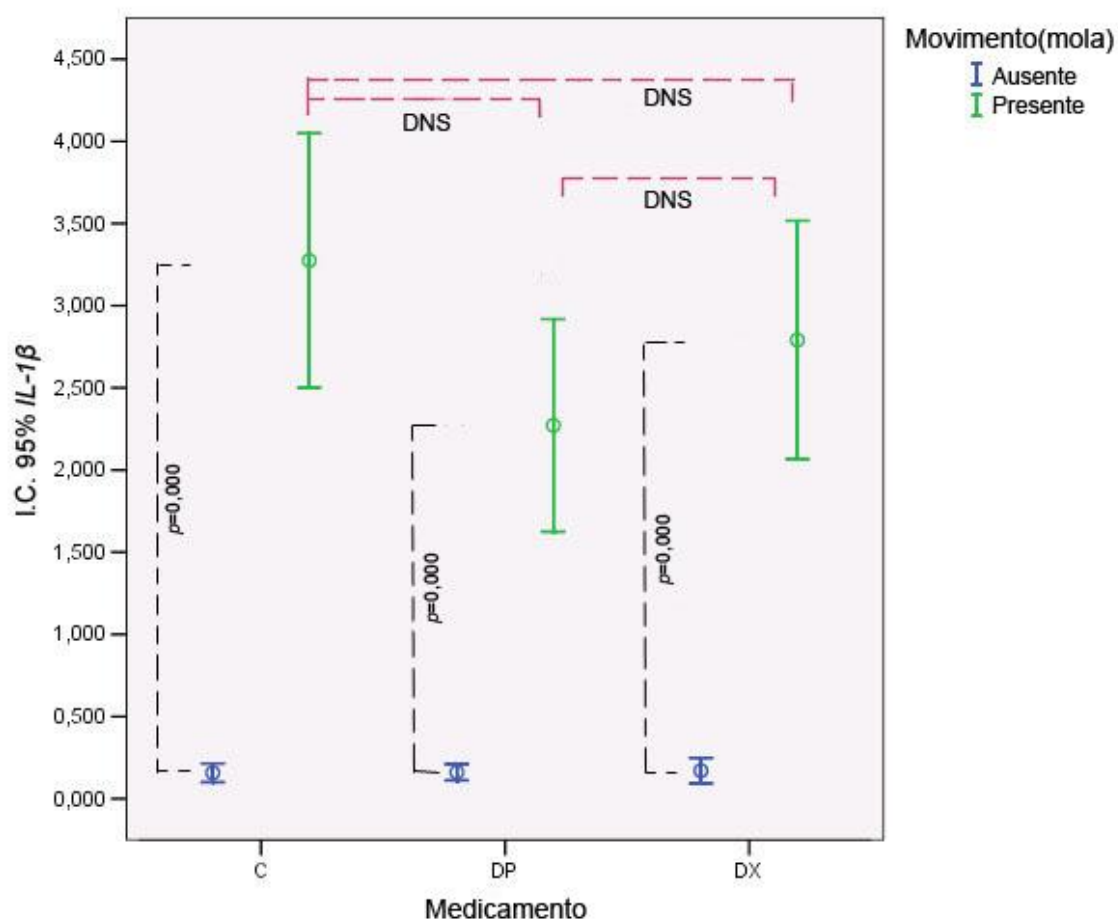
Movimento (mola)	C	DP	DX	Diferença intergrupo
	$\bar{x} \pm \sigma$	$\bar{x} \pm \sigma$	$\bar{x} \pm \sigma$	p
Ausente	0,16 $\pm$ 0,15	0,16 $\pm$ 1,32	0,17 $\pm$ 0,21	DNS
Presente	3,27 $\pm$ 1,87	2,27 $\pm$ 1,57	2,79 $\pm$ 1,76	DNS
Diferença intergrupo p	0,000	0,000	0,000	

Fonte: Valores da Pesquisa

Nota: Valores discriminando dados de Dias de Tratamento

Note 2: Calculado usando $p < 0,05$

Legendas: C $\rightarrow$ Grupo de Controle
 DP $\rightarrow$ Diclofenaco de Potássio
 DX $\rightarrow$ Dexametasona
 $\bar{x} \pm \sigma \rightarrow$ Média $\pm$ Desvio Padrão



Teste de homogeneidade de variâncias para IL-1 β mRNA – Dias de Tratamento

Statísticas de Levene	df1	df2	Sig.
22,92695491	5	159	0,000

Fonte: Valores da Pesquisa

Nota: Valores discriminando dados de Movimento e Medicamento

Nota 2: Distribuição homogênea $p < 0,05$

Teste de comparações múltiplas Games-Howell para IL-1 β mRNA – Dias de Tratamento

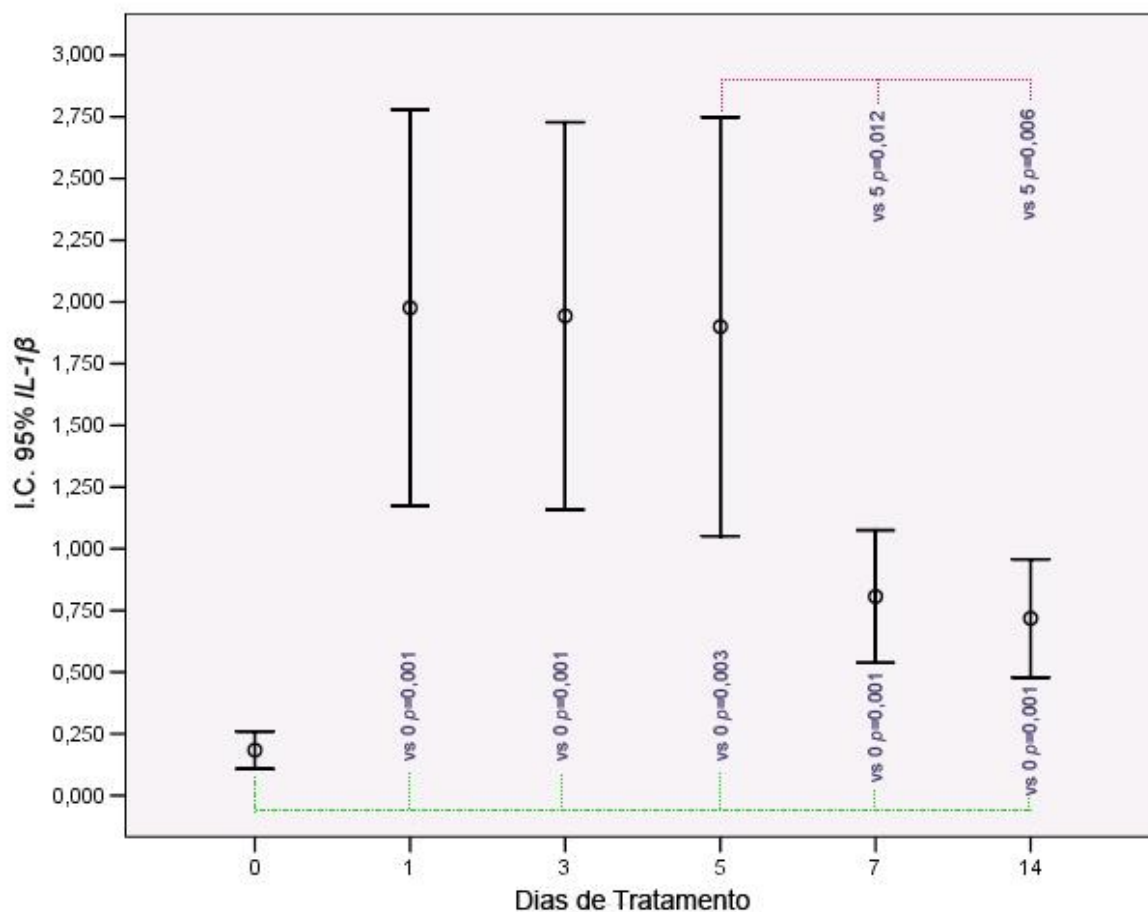
Dias de Tratamento	$\bar{x} \pm \sigma$	Diferença intergrupo p
0	0,18 $\pm$ 0,14	0x1($p=0,001$), 0x3($p=0,001$), 0x5($p=0,003$), 0x7($p=0,001$), 0x14($p=0,001$)
1	1,98 $\pm$ 2,15	1x0($p=0,001$), 1x7($p=0,007$), 1x14($p=0,004$)
3	1,94 $\pm$ 2,10	3x0($p=0,001$), 3x7($p=0,009$), 3x14($p=0,005$)
5	1,90 $\pm$ 2,27	5x0($p=0,003$), 5x7($p=0,012$), 5x14($p=0,006$)
7	0,81 $\pm$ 0,72	7x0($p=0,001$), 7x1($p=0,007$), 7x3($p=0,009$), 7x5($p=0,012$)
14	0,72 $\pm$ 0,64	14x0($p=0,001$), 14x1($p=0,004$), 14x3($p=0,005$), 14x5($p=0,006$)

Fonte: Valores da Pesquisa

Nota: Valores discriminando dados de Movimento e Medicamento

Note 2: Calculado usando $p < 0,05$

Legenda: $\bar{x} \pm \sigma \rightarrow$ Média $\pm$ Desvio Padrão



Teste de comparações múltiplas Games-Howell para IL-1 β mRNA – Dias de Tratamento, Movimento (mola) e Medicamento

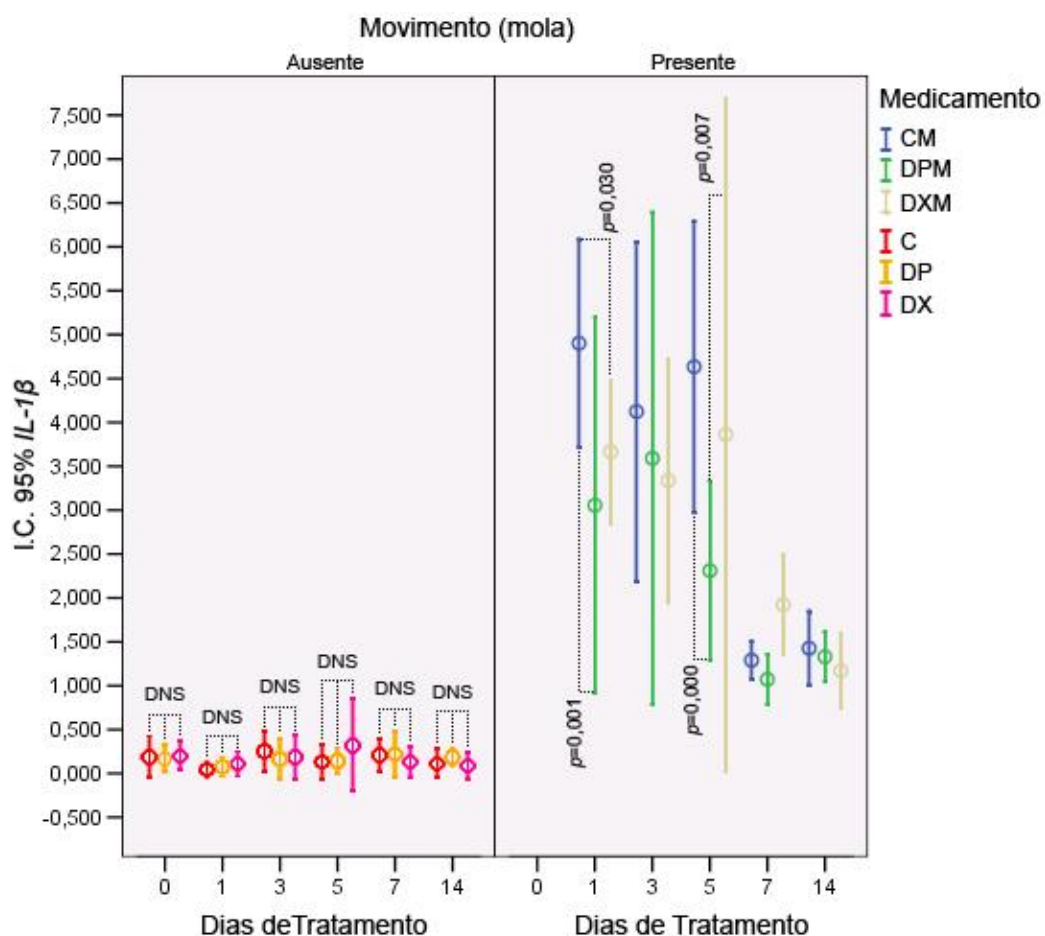
Dias de Tratamento	CxCM ($\bar{\chi} \pm \sigma$) x ($\bar{\chi} \pm \sigma$)	DPxDPM ($\bar{\chi} \pm \sigma$) x ($\bar{\chi} \pm \sigma$)	DXxDXM ($\bar{\chi} \pm \sigma$) x ($\bar{\chi} \pm \sigma$)
1	(0,04 $\pm$ 0,06) x (4,90 $\pm$ 0,96) $p=0,009$	(0,08 $\pm$ 0,08) x (3,06 $\pm$ 1,73) $p=0,000$	(0,11 $\pm$ 0,10) x (3,67 $\pm$ 0,66) $p=0,006$
3	(0,26 $\pm$ 0,18) x (4,12 $\pm$ 1,56) $p=0,000$	(0,16 $\pm$ 0,17) x (3,59 $\pm$ 2,26) $p=0,000$	(0,19 $\pm$ 0,20) x (3,34 $\pm$ 1,12) $p=0,000$
5	(0,13 $\pm$ 0,16) x (4,63 $\pm$ 1,33) $p=0,041$	(0,15 $\pm$ 0,11) x (2,31 $\pm$ 0,82) $p=0,000$	(0,32 $\pm$ 0,42) x (3,86 $\pm$ 3,09) $p=0,000$
7	(0,21 $\pm$ 0,14) x (1,29 $\pm$ 0,17) $p=0,001$	(0,22 $\pm$ 0,21) x (1,07 $\pm$ 0,23) $p=0,022$	(0,13 $\pm$ 0,14) x (1,92 $\pm$ 0,46) $p=0,019$
14	(0,11 $\pm$ 0,13) x (1,43 $\pm$ 0,34) $p=0,017$	(0,18 $\pm$ 0,08) x (1,33 $\pm$ 0,23) $p=0,005$	(0,09 $\pm$ 0,12) x (1,17 $\pm$ 0,34) $p=0,041$

Fonte: Valores da Pesquisa

Nota: Valores de Medicamento discriminando dados de Dias de Tratamento e Movimento

Note 2: Calculado usando $p < 0,05$

Legendas: C $\rightarrow$ Grupo de Controle sem Movimento (mola)
 CM $\rightarrow$ Grupo de Controle com Movimento (mola)
 DP $\rightarrow$ Diclofenaco de Potássio sem Movimento (mola)
 DPM $\rightarrow$ Diclofenaco de Potássio com Movimento (mola)
 DX $\rightarrow$ Dexametasona sem Movimento (mola)
 DXM $\rightarrow$ Dexametasona com Movimento (mola)
 $\bar{\chi} \pm \sigma \rightarrow$ Média $\pm$ Desvio Padrão



Teste de comparações múltiplas Games-Howell para IL-1 β mRNA – Dias de Tratamento, Movimento (mola) e Medicamento

Movimento (mola)	Dias	CM	DPM	DXM	Diferença intergrupo
		$\bar{x} \pm \sigma$	$\bar{x} \pm \sigma$	$\bar{x} \pm \sigma$	<i>P</i>
Presente	1	4,90 $\pm$ 0,96	3,06 $\pm$ 1,73	3,67 $\pm$ 0,66	DPMxCM(<i>p</i> =0,001), DXMxCM(<i>p</i> =0,030)
	3	4,12 $\pm$ 1,56	3,59 $\pm$ 2,26	3,34 $\pm$ 1,12	DNS
	5	4,63 $\pm$ 1,33	2,31 $\pm$ 0,82	3,86 $\pm$ 3,09	DPMxCM(<i>p</i> =0,000), DPMxDXM(<i>p</i> =0,007)
	7	1,29 $\pm$ 0,17	1,07 $\pm$ 0,23	1,92 $\pm$ 0,46	DNS
	14	1,43 $\pm$ 0,34	1,33 $\pm$ 0,23	1,17 $\pm$ 0,34	DNS

Fonte: Valores da Pesquisa

Nota: Calculado usando *p*<0,05

Legendas: CM $\rightarrow$ Grupo de Controle com Movimento (mola)
DPM $\rightarrow$ Diclofenaco de Potássio com Movimento (mola)
DXM $\rightarrow$ Dexametasona com Movimento (mola)
 $\bar{x} \pm \sigma \rightarrow$ Média $\pm$ Desvio Padrão

ANEXO C – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO – AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS & DENTOFACIAL ORTHOPEDICS

Information for Authors

Electronic manuscript submission and review

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

To submit or review an article, please go to the **AJO-DO** EES website: ees.elsevier.com/ajodo.

Send other correspondence to:

Dr. Vincent G. Kokich, 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
E-mail: vgkokich@u.washington.edu

General Information

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

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

Statements and opinions expressed in the articles and communications herein are those of the author(s) and not necessarily those of the editor(s) or publisher, and the editor(s) and publisher disclaim any responsibility or liability for such material. Neither the editor(s) nor the publisher guarantees, warrants, or endorses any product or service advertised in this publication; neither do they guarantee any claim made by the manufacturer of any product or service. Each reader must determine whether to act on the information in this publication, and neither the *Journal* nor its sponsoring organizations shall be liable for any injury due to the publication of erroneous information.

Guidelines for Original Articles

Submit Original Articles via EES: ees.elsevier.com/ajodo. 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. You should express measurements in metric units, whenever practical. Refer to teeth by

their full name or their FDI tooth number. For style questions, refer to the *AMA Manual of Style*, 9th edition. Cite references selectively, and number them in the order cited. Make sure that all references have been mentioned in the text. Follow the format for references in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997;126:36-47); <http://www.icmje.org>. Include the list of references with the manuscript proper. Submit figures and tables separately (see below); do not embed figures in the word processing document.

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

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

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

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

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

8. 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.

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

10. Systematic Reviews and Meta-Analyses must be accompanied by the current PRISMA checklist and flow diagram. This information can be downloaded from www.prisma-statement.org.

11. Randomized Clinical Trials must be accompanied by the current CONSORT statement, checklist, and flow diagram. This information can be downloaded from www.consort-statement.org.

Other Articles

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

Case Reports will be evaluated for completeness and quality of records, quality of treatment, uniqueness of the case, and quality of the manuscript. A high quality manuscript must include the following sections: introduction; diagnosis; etiology; treatment objectives, treatment alternatives, treatment progress, and treatment results; and discussion. The submitted figures must include extraoral and intraoral photographs and dental casts, panoramic radiographs, cephalometric radiographs, and tracings from both pretreatment and posttreatment, and progress or retention figures as appropriate. Complete Case Report Guidelines can be downloaded from Case Report Guidelines. Techno Bytes items report on emerging technological developments and products for use by 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. Letters to the Editor must be less than 500 words including references. Send letters or questions directly to the editor, via e-mail: vgkokich@u.washington.edu. Submit a signed copyright release with the letter.

Brief, substantiated commentary on subjects of interest to the orthodontic profession is published occasionally as a Guest Editorial or Special Article. Send Guest Editorials or Special Articles directly to the editor, via e-mail: vgkokich@u.washington.edu. Submit a signed copyright release with the submission. Books and monographs (domestic and foreign) will be reviewed, depending upon their interest and value to subscribers. Send books to the Editor in Chief, Dr. Vincent G. Kokich, Department of Orthodontics, University of Washington D-569, HSC Box 357446, Seattle, WA 98195-7446. 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 February 2011