

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

GABRIELA PINTO MOLINA DA SILVA

AÇÃO DO DICLOFENACO E DEXAMETASONA NA EXPRESSÃO GÊNICA DA
MMP-1 NOS TECIDOS PERIODONTAIS DURANTE O MOVIMENTO
ORTODÔNTICO

CURITIBA

2011

GABRIELA PINTO MOLINA DA SILVA, C.D.

**AÇÃO DO DICLOFENACO E DEXAMETASONA NA EXPRESSÃO GÊNICA DA
MMP-1 NOS TECIDOS PERIODONTAIS DURANTE O MOVIMENTO
ORTODÔNTICO**

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

Pós-graduanda: Gabriela Pinto Molina da Silva
Orientador: Prof. Dr. Orlando Tanaka
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Paula Cristina Trevilatto

CURITIBA

2011

À minha mãe, **Joaquina**, por acreditar e torcer por mim e não medir esforços para minha educação. Você é um exemplo de determinação, muitas vezes renunciou dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Obrigada por estar sempre do meu lado, pelo amor, pela compreensão, pelo incentivo.

A meu pai, **Sérgio**, que apesar da pouca convivência, sempre me deu amor e apoio em todas as minhas decisões.

À minha irmã, **Cecília**, pela amizade, amor e estímulo, por estar do meu lado em todos os momentos bons e ruins mesmo quando estava longe. Obrigada pela compreensão e força nos momentos difíceis, em que achei que não conseguiria.

Essa conquista é para vocês!

DEDICO.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Orlando Tanaka** por todos os ensinamentos, pela confiança em mim depositada e pelo apoio nos momentos difíceis. Agradeço pela condução deste trabalho e pela amizade. Quem ouve suas palavras não aprende apenas ciência, mas entende um pouco mais da vida. Quem recebe seus ensinamentos certamente será uma pessoa melhor! Você é um exemplo de profissional! Obrigada!

À minha co-orientadora, **Prof^a. Dr^a. Paula Cristina Trevilatto**, por tornar essa pesquisa uma realidade, por todos os ensinamentos, por disponibilizar seu laboratório para nossa pesquisa e pela amizade, contribuições indispensáveis para a realização deste trabalho. Obrigada!

Ao **Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet**, pela pronta ajuda e disponibilidade em realizar a análise de RT-PCR, tornando essa pesquisa possível. Você foi muito importante para a realização deste trabalho! Obrigada!

À minha colega de mestrado e grande amiga, **Ana Leticia Rocha Avila**, por dividir comigo os momentos românticos e não-românticos que passamos nesses dois anos, pela alegria, por me escutar e aconselhar nos momentos difíceis e de dúvida, pelas caronas e hospedagem na sua casa sempre que precisei. Sua amizade é muito importante para mim! Obrigada a você e à sua família!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ter me permitido o dom da vida.

Ao meu padrasto, **Deli Maciel**, por ter ajudado a minha mãe a fazer o meu sonho virar realidade.

Aos meus avôs **Valentin Molina e Elena Molina**, por todo incentivo aos estudos.

Aos meus tios **Carlos Molina e Carla Molina**, minha segunda família em Porto Alegre, pelo carinho e ajuda dispensada sempre que precisei.

Aos meus dindos **Eliana Matos e Claudionir Matos**, minha segunda família em Taquara, por todo apoio.

A uma pessoa muito especial, **Eduardo Schwartzer**, pelo carinho e paciência, por estar sempre presente mesmo distante, pelo apoio na minha decisão de fazer mestrado.

À **Luciana Borges Retamoso**, que se tornou uma querida amiga, pela ajuda na escolha do tema da dissertação, pelo incentivo a desenvolver pesquisa e total disponibilidade para responder minhas dúvidas.

Ao doutorando **José Vinicius Bolognesi Maciel**, pela disponibilidade em ajudar, pelas idéias para o tema da dissertação e ensinamentos sobre pesquisa e por tirar minhas dúvidas sempre que necessário.

À **Tatiana Blaya Luz** pela indicação do curso e por toda amizade e apoio.

Ao professor **Dr. Odilon Guariza Filho**, exemplo de profissional. Obrigada pela amizade, pelos conselhos, por seu meu ortodontista e pelos conhecimentos transmitidos.

À professora **Dra. Elisa Souza Camargo**, um exemplo de organização, uma pessoa atenciosa e que sempre ajudou prontamente. Obrigada pelos ensinamentos.

Ao professor **Dr. Hiroshi Maruo**, pelo agradável convívio e conhecimentos transmitidos.

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

Ao diretor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Professor **Dr. Sérgio Vieira**, pelo apoio e atenção.

Ao funcionário **Misael Gomes Barbosa**, pela contribuição nas etapas da parte experimental da pesquisa, pela disponibilidade e amizade.

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

Aos meus colegas de turma do mestrado, **Cristina Hepp, Denise Manareli, Lilian Karakida, Ismael Signori, Maria Cecília Añez** em especial a **Dolores Fátima Campos Navarro**, que dividiu comigo a árdua tarefa da realização prática deste experimento e aos meus queridos amigos que admiro muito, **Alinne Rymovicz, Maiara Ronsani e Thiago Meira**, cuja amizade foi essencial nestes 2 anos.

À secretária do programa de Pós-Graduação em Odontologia **Neide Reis Borges** pela amizade e disposição sempre que precisei.

À funcionária da clínica de Ortodontia, **Maria Nilce Silva Reis**, pela alegria e dedicação na realização de seu trabalho.

E a todos aqueles que de alguma forma, contribuíram para o êxito deste trabalho, bem como para minha formação pessoal e profissional.

“...É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar, ainda em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver...”

(Martin Luther King)

SUMÁRIO

1 ARTIGO EM PORTUGUÊS	9
RESUMO.....	10
INTRODUÇÃO	111
OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....	343
MATERIAL E MÉTODOS	144
RESULTADOS.....	188
DISCUSSÃO	19
CONCLUSÕES.....	23
REFERÊNCIAS.....	234
FIGURAS	29
2 ARTIGO EM INGLÊS	333
ABSTRACT.....	34
INTRODUCTION.....	35
MATERIAL AND METHODS.....	37
RESULTS.....	40
DISCUSSION.....	41
CONCLUSIONS.....	455
REFERENCES.....	466
FIGURES	511
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	555
ANEXO B – MATERIAIS E MÉTODOS.....	566
ANEXO C - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	622

1 ARTIGO EM PORTUGUÊS

RESUMO

Introdução: A metaloproteinase-1 é uma enzima importante na remodelação dos tecidos periodontais durante o movimento dentário ortodôntico. É comum o uso de antiinflamatórios esteróides (AIES) e não-esteróides (AINES) na terapêutica de doenças crônicas, com possibilidade de interferência na expressão da MMP-1 e, por sua vez na ação da biomecânica do tratamento ortodôntico. **Objetivo:** investigar os níveis de transcritos gênicos da MMP-1 nos tecidos periodontais de ratos com movimentação ortodôntica, em diferentes estágios do movimento dentário induzido, sob a ação dos antiinflamatórios diclofenaco de potássio e dexametasona. **Método:** uma força de 50 cN liberada por uma mola fechada de níquel-titânio foi aplicada no primeiro molar superior direito, para movê-lo mesialmente, em noventa (n=90) ratos machos. Um grupo recebeu doses diárias de solução salina 0,9%, via IM, para simular o estresse da injeção, um segundo grupo recebeu doses diárias de diclofenaco de potássio (5 mg/kg, via IM) e um terceiro recebeu doses diárias de dexametasona (0,5 mg/kg, via IM). Os animais de cada grupo foram mortos após 0, 1, 3, 5, 7 e 14 dias de movimentação dentária induzida. A expressão da MMP-1 foi quantificada por PCR em tempo real e os dados foram comparados pelo teste ANOVA a três critérios, com nível de significância de 0,05. **Resultados:** os níveis de transcritos gênicos foram aumentados nos grupos com movimentação dentária em todos os dias de ação da mola. Observou-se que nos grupos sob ação da mola com uso de antiinflamatórios esteróides e não esteróides houve diminuição da expressão da MMP-1 comparados com o grupo controle nos dias 1, 3, 5 e 7, não apresentando diferença estatisticamente significativa no dia 14. **Conclusão:** a aplicação de forças ortodônticas nos tecidos periodontais promoveu o aumento significativo dos transcritos gênicos de MMP-1. Os antiinflamatórios demonstraram ter um efeito inibitório na expressão da MMP-1 durante o período inicial da movimentação dentária induzida, sugerindo um retardo no remodelamento da matriz extracelular, que pode proporcionar um tempo de tratamento ortodôntico mais longo.

PALAVRAS-CHAVE: Movimento dentário; Diclofenaco de potássio; Dexametasona; Metaloproteinase da matriz-1.

INTRODUÇÃO

O movimento dentário ortodôntico ocorre pela aplicação de forças mecânicas controladas aos dentes e resulta em remodelação das estruturas periodontais adjacentes aos dentes movimentados, incluindo ligamento periodontal (LP) e osso alveolar (KRISHNAN E DAVIDOVITCH, 2006). Os variados graus de magnitude, frequência e duração de aplicação da força biomecânica aos dentes expressam extensivas mudanças estruturais e bioquímicas, primeiramente no LP (PROFFIT, FIELDS E SARVER, 2007) para, então, ocorrer o remodelamento no osso alveolar. A transdução dessas forças mecânicas às células provoca uma resposta biológica, que tem sido descrita como inflamação asséptica (GARLET et al., 2007).

A fase inicial do movimento dentário induzido usualmente envolve mudanças vasculares, migração de leucócitos para fora dos capilares do LP levando à ativação celular seguida da síntese e liberação de substâncias biológicas ativas, como enzimas, prostaglandinas (PGEs), citocinas e fatores de crescimento no periodonto (ALHASHIMI et al., 2001; GARLET et al., 2007). Estudos prévios sugerem que esses mediadores desempenham um papel importante no remodelamento periodontal que é dependente, entre outros fatores, da reabsorção e aposição da matriz extracelular (MEC) (REITAN, 1985).

A movimentação dentária induzida, em que as forças exercidas sobre os dentes são transmitidas aos tecidos periodontais circunvizinhos, desempenha um papel essencial na remodelação da MEC (WADDINGTON E EMBERY, 2001), cujos principais componentes são o colágeno tipo I e III (YAMAUCHI et al., 1986). A aplicação de força sobre o dente interrompe o equilíbrio fisiológico existente entre síntese e degradação do colágeno (LEONARDI et al., 2007). Uma classe de enzimas proteolíticas, chamadas metaloproteinases da matriz (MMPs), contribui significativamente para regular o remodelamento dos tecidos periodontais (WELGUS, JEFFREY E EISEN, 1981; BIRKEDAL-HANSEN, 1993). MMP-1, MMP-8 e MMP-13 compõem a subfamília das collagenases em humanos. As collagenases são os únicos membros da família das MMPs que degradam colágeno nativo fibrilar do tipo I, II e III (LEONARDI et al., 2007). Estas proteases

são produzidas por uma variedade de células, incluindo fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

O movimento dentário ortodôntico pode ser influenciado pela administração de fármacos (KEHOE E ZARRINNA, 1996; DE CARLOS et al., 2006; GONZALES et al., 2009). O diclofenaco de potássio é um antiinflamatório não-esteróide (AINE) que inibe a ciclooxigenase 1 e 2 (BAEK et al., 2001), bloqueando a formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico e diminuindo a resposta inflamatória, pela inibição da síntese de interleucinas (ILs) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (BOTTING, 2006). A dexametasona é um potente antiinflamatório esteróide (AIE) que inibe a liberação de prostaglandinas e leucotrienos (LT), através da inibição da fosfolipase A2 (LUO et al., 2003), alterando a atividade dos fatores de crescimento (SWANSON et al., 2006), e inibindo a produção e atividade das ILs (RHEN et al., 2005).

Devido ao aumento da procura de pacientes por tratamento ortodôntico, visto que muitos destes pacientes utilizam antiinflamatórios esteróides ou não-esteróides para tratamento de doenças crônicas, e porque mediadores pró-inflamatórios desempenham um papel fundamental na regulação das MMPs, a hipótese deste estudo é que a administração de medicamentos antiinflamatórios exerce efeito na expressão da MMP-1, durante o tratamento ortodôntico.

OBJETIVO GERAL

Quantificar os níveis de transcritos gênicos da metaloproteinase da matriz-1 (MMP-1) nos tecidos periodontais de ratos sob o efeito dos antiinflamatórios diclofenaco de potássio e dexametasona, durante diferentes estágios do movimento dentário induzido.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Quantificar os níveis de transcritos gênicos da MMP-1:

- 1) Nos dias 0, 1, 3, 5, 7 e 14 de movimento dentário induzido.
- 2) Nos dias 0, 1, 3, 5, 7 e 14 de movimento dentário induzido sob ação do antiinflamatório não-esteróide diclofenaco de potássio.
- 3) Nos dias 0, 1, 3, 5, 7 e 14 de movimento dentário induzido sob ação do antiinflamatório esteróide dexametasona.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento animal, movimento dentário induzido, e preparo dos tecidos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) e registrada sob parecer CEUA - PUCPR nº 507 (Anexo A, página 55).

Foram utilizados 90 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) machos da linhagem *Wistar* com 12 semanas de vida, pesando aproximadamente 300 – 350 g, provenientes do Biotério da PUCPR. Os animais permaneceram acondicionados em caixas de propileno semi-fosco (3 animais / caixa), à temperatura entre 19 °C e 22 °C, com ração e água, fornecidos *ad libitum*. A ração fornecida (Nuvilab CR1 farelada, Paraná, Brasil) foi triturada para evitar fraturas no aparelho. Foi respeitado o fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro para evitar alterações no ciclo metabólico.

O movimento dentário foi induzido por meio de mola fechada de níquel-titânio (3M Unitek, ref. 344-150, Califórnia, CA), que foi descrito previamente (ALHASHIMI et al., 2001; GONZALES et al., 2009). A mola ativada produziu força recíproca entre os incisivos superiores e o primeiro molar superior direito (Fig. 1, página 29) com magnitude de 50 cN (GONZALES et al., 2009), mensurada por meio de dinamômetro (Dentaurum, nº 1005004, Ispringen, Alemanha) devidamente calibrado e aferido.

A mola ortodôntica foi instalada nos animais sob anestesia geral, induzida por injeção intramuscular de ketamina (Vetanarcol®, Lab. König S.A., Lote 00103, Avellaneda, Argentina) na dose de 1,8 mg/kg e xilazina (Rompun®, Lab. Bayer, Lote 00404, São Paulo, Brasil) na dose de 1,1 mg/kg.

Os primeiros molares superiores direitos receberam a força ortodôntica e foram divididos em 3 grupos: CM (controle com movimento), DPM (diclofenaco de potássio com movimento) e DXM (dexametasona com movimento). Os primeiros molares superiores esquerdos não receberam força ortodôntica e foram utilizados como controle do lado contralateral (ONG et al., 2000; BLETSA et al., 2006; LEE et al., 2009), e foram divididos em 3 grupos: C (controle sem movimento), DP (diclofenaco de potássio sem movimento), e DX (dexametasona sem movimento).

Cada um dos grupos experimentais foi subdividido em 0, 1, 3, 5, 7 e 14 dias de movimento dentário (5 ratos por subgrupo). A mola não foi reativada durante o experimento.

Os animais dos grupos C e CM receberam doses diárias de 0,05 mL desolução salina 0,9%, via intramuscular, para simular o estresse recebido pelos animais com a injeção. Os animais dos grupos DP e DPM receberam diariamente diclofenaco de potássio (Cataflam®, Novartis Biociências, São Paulo-SP, Brasil), na dose de 5 mg/kg (KRISCHAK GD et al., 2007; RETAMOSO et al., 2010), via intramuscular. Finalmente, os animais dos grupos DX e DXM receberam doses diárias de 0,5 mg/kg (OMOIGUI S, 1995; ALLEN, PRINGLE E SMITH, 1998) de dexametasona (Decadron®, Achè Lab S.A., Guarulhos-SP, Brasil), via intramuscular. As administrações iniciaram cinco dias antes da instalação da mola em todos os grupos na tentativa de simular o uso contínuo desses medicamentos pelos pacientes ortodônticos, e prosseguiram ao longo dos períodos de movimentação dentária, realizadas sempre entre 10 e 12 horas da manhã.

Os animais foram mortos após 0, 1, 3, 5, 7 e 14 dias de movimentação ortodôntica, ao término do período experimental, por sobredose de solução anestésica (Ketamina, 5,4 mg/kg). As cabeças foram dissecadas e a região do 1º molar superior direito e esquerdo com o seu periodonto adjacente foram removidas, na forma de bloco, todos de mesmo tamanho. Para padronizar o corte dos blocos, foi realizado um piloto, e todos os cortes foram feitos sempre pelo mesmo operador.

Extração do RNA e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

Os blocos foram imediatamente triturados mecanicamente com auxílio de grau e pistilo esterilizados até que todo o osso e dente fossem transformados numa massa homogênea. Neste momento, foi adicionado à massa obtida, 1 mL de TRIzol® (Invitrogen, Califórnia, CA), solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, com o objetivo de remover todo o material celular, mantendo a integridade apenas das moléculas de RNA. O material homogeneizado foi, então, imediatamente levado para congelamento a -80 °C.

Num segundo momento, as amostras foram descongeladas e foram aguardados 5 minutos em temperatura ambiente (15-30°C). Alíquotas de 0,2 mL de clorofórmio foram adicionadas em cada amostra e as misturas foram invertidas 15 vezes e agitadas em *vórtex* por 15 seg, sendo incubada por 1 min em temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos e as fases aquosas foram transferidas com auxílio de micropipeta para novos microtubos.

O RNA em solução foi precipitado com adição de 0,5 mL de álcool isopropílico, seguido de agitação da solução (invertida 5 vezes) para homogeneizar as soluções e foi incubada por 20 min, a -20 °C.

O material foi centrifugado a 12.000 g por 10 min, sendo os sobrenadantes descartados e os “*pellets*” lavados em etanol 75%. As amostras foram misturadas em *vórtex* e centrifugadas a 12.000 g por 5 min. Os sobrenadantes foram removidos e os “*pellets*” formados foram secos em temperatura ambiente e dissolvidos em 0,4 mL de água livre de RNase (H₂O_{DEPC}), e, a seguir, armazenados a – 80 °C.

O cDNA foi sintetizado usando 3 µg de RNA, através de reação de transcriptase reversa (Superscript III; Invitrogen, Carlsbad, CA) como descrito por CARDOSO et al. (2008). Análise quantitativa de RNA mensageiro (mRNA) através da reação em cadeia da polimerase em tempo real foi realizada utilizando o sistema *Syber Green* (Applied Biosystems, Warrington, UK). *Syber Green PCR MasterMix* (Applied Biosystems), 100 nM de primers específicos, e 2.5 ng de cDNA foram utilizados em cada reação. As seqüências dos primers, a predição dos tamanhos do amplicons, e o anelamento e temperatura de fusão, projetados usando o software *Primerexpress* (Applied Biosystems). As condições-padrão do PCR eram 95 °C (10 min), seguido por 40 ciclos de 94 °C (1 min), e 72 °C (2 min), e pela curva de desnaturação padrão. Para análise do mRNA, o nível relativo da expressão gênica foi calculada em relação à expressão da β-actina utilizando o método Ct (*cycle threshold method*). Para análise do DNA, o nível de expressão gênica foi determinado usando o método Ct e normalizado pelo peso do tecido. Controles negativos sem cDNA ou DNA, e sem transcriptase reversa, também foram realizados.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados usando o pacote estatístico SPSS 18.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL). O teste ANOVA a três critérios foi utilizado para comparar diferença entre as médias da variável transcritos gênicos da MMP-1 entre os grupos Controle (C+CM), Diclofenaco de Potássio (DP+DPM) e Dexametasona (DX+DXM), presença ou ausência de mola ortodôntica produzindo movimento ortodôntico, e tempo (dias 0, 1, 3, 5, 7 e 14). Para verificar homogeneidade o teste de Levene foi utilizado. O teste de Games–Howell para variâncias heterogêneas foi utilizado para identificar diferenças entre os grupos, com um nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

Quando a expressão da MMP-1 foi analisada nos grupos com e sem mola ortodôntica, estratificados por dias de tratamento, mas não pelo uso de antiinflamatórios (Fig. 2, página 30), foi encontrado que os níveis de transcritos gênicos da MMP-1 estavam aumentados significativamente nos grupos com mola ortodôntica em todos os dias de tratamento comparados aos grupos sem ação da mola. Entre os grupos com presença de mola ortodôntica, foi encontrada uma expressão similar de MMP-1 nos dias 1, 3, 5 e 7. Contudo, no dia 7, os níveis de expressão começaram a decair, sendo encontrados no dia 14 os menores níveis de expressão ($p < 0,05$) (Fig. 2, página 30). Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos sem mola ortodôntica ($p > 0,05$) (Fig. 2, página 30).

Em se considerando o uso de antiinflamatórios esteróides e não esteróides, não estratificando pela presença e ausência de mola e dias de tratamento (Fig. 3, página 31), os níveis de transcritos gênicos da MMP-1 estavam diminuídos nos grupos diclofenaco de potássio ($p = 0,036$) e dexametasona ($p = 0,008$) em relação ao controle, enquanto não foi vista diferença estatisticamente significativa entre diclofenaco de potássio e dexametasona ($p = 0,582$).

Quando as amostras foram estratificadas nas três variáveis: i) presença ou ausência de mola ortodôntica, ii) uso de antiinflamatórios, iii) tempo de tratamento (Fig. 4, página 32), a expressão da MMP-1 foi diminuída nos dias 1, 3, 5 e 7 nos grupos DPM e DXM, em relação ao CM, enquanto no dia 5, houve também diferença entre os grupos DPM e DXM. Finalmente, no dia 14, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CM, DPM e DXM. Houve níveis aumentados de transcritos gênicos da MMP-1 nos grupos com mola ortodôntica, comparados com os grupos sem mola, em todos os dias de tratamento. Além disso, não houve diferença estatística entre os grupos sem mola ortodôntica (Fig. 4, página 32).

DISCUSSÃO

Este estudo transversal caso-controle, analisou os níveis de transcrição da MMP-1 nos tecidos dentais e periodontais de ratos tratados, com e sem a ação de força ortodôntica, sob a ação dos antiinflamatórios diclofenaco de potássio e dexametasona em diferentes estágios de movimentação dentária induzida.

A atuação da força parece causar respostas biomecânicas e estruturais em fibroblastos periodontais que, em consequência, sintetizam e degradam colágeno (TEN CATE et al., 1976) e produzem metaloproteinases (MEIKLE et al., 1980). Geralmente, a expressão da MMP-1 é regulada por mediadores pró-inflamatórios, tais como PGEs, ILs e TNF- α , (NISHIKAWA et al. 2002; SAKAKI et al., 2004; KIM et al., 2005; XIANG et al., 2009), que, por sua vez, são reguladas pelo estresse mecânico (LONG et al., 2002; YANG et al., 2005).

Neste estudo, foi observado um aumento nos níveis de transcritos gênicos da MMP-1 nos grupos sob ação de força ortodôntica comparados com os grupos que não receberam ação de força. Esses achados estão de acordo com os de Redlich et al. (2001), que sugeriram que a força ortodôntica aumenta significativamente os níveis de mRNA para MMP-1 e, depois da remoção da força, a expressão gênica da MMP-1 diminuiu significativamente. Esse conceito é apoiado pelos resultados de estudos *in vivo* em seres humanos, em dentes submetidos à movimentação dentária ortodôntica, onde foi mostrado que os níveis de expressão da MMP-1 aumentaram depois da aplicação da força (CANTARELLA et al., 2006, GARLET et al., 2007, BILDT et al., 2009).

Nos grupos com mola ortodôntica (considerando grupos com e sem uso de antiinflamatórios), quando estratificados por dias de tratamento, foi encontrada expressão de MMP-1 aumentada e similar nos dias 1, 3, 5 e 7. Contudo, no dia 7 os níveis de transcritos gênicos começaram a diminuir, com menor grau de expressão no 14º dia. Como previamente discutido, desde que há um efeito sinérgico estimulatório de força mecânica, mediadores pró-inflamatórios e liberação de MMP-1, sugerimos que o aumento transitório da expressão da MMP-1 durante os primeiros sete dias deve ter sido regulado via mediadores inflamatórios, direta ou indiretamente. Alhashimi et al. (2001) demonstraram que o

nível máximo de IL1- β foi detectado 3 dias depois da aplicação da força ortodôntica. Em seu trabalho, os níveis diminuídos foram observados entre os dias 7 e 10. Além disso, a mola ortodôntica não foi reativada durante o experimento. Tal fato pode explicar as razões pelo qual a MMP-1 estava diminuída no 14º dia.

Retamoso et al. (2009) observaram que no 3º dia de movimento ortodôntico em ratos, o colágeno foi depositado como fibrilas finas. No dia 7, um nível intermediário de organização foi encontrado e no dia 14 a matriz óssea foi composta inteiramente por colágeno maduro. Desde que as fibras do LP são danificadas pelo estresse mecânico gerado pelas forças ortodônticas (RYGH et al., 1986), parece que, durante o movimento dentário ortodôntico, esse colágeno quebrado fisicamente é degradado e reconstruído coordenadamente, no processo de reparo tecidual (TAKAHASHI et al., 2003). Portanto, no dia 3 a presença da MMP-1 dever ser mais requerida que nos dias 7 e 14 para degradar as fibras antigas, permitindo a renovação e reorganização do colágeno para permitir a nova posição do dente. É importante mencionar que esses dados foram observados nos grupos com mola ortodôntica, incluindo ambos os grupos (com e sem aplicação de antiinflamatórios), sendo a sua expressão menor pela ação dos antiinflamatórios que se fosse analisada somente no grupo controle.

Os AINEs e AIEs agem inibindo as enzimas COX-1 e 2, bloqueando a formação de PGEs a partir do ácido araquidônico (BAEK et al., 2001; REHM et al., 2005) e diminuindo os níveis de expressão de citocinas (REHM et al., 2005; BOTTING et al., 2006). Os níveis de transcritos gênicos da MMP-1 foram diminuídos nos grupos tratados ortodonticamente sob ação dos antiinflamatórios, demonstrando o potencial de inibição desses medicamentos na expressão gênica da MMP-1 durante o movimento dentário ortodôntico. Como a expressão da MMP-1 é regulada por IL-1, TNF- α e PGEs, sugere-se que os AINEs e AIEs, por inibir estes mediadores, irão inibir a MMP-1. Além disso, a ação de AINEs e AIEs está relacionada com a diminuição dos níveis do fator de crescimento- β (TGF- β), responsável pela proliferação dos fibroblastos (BAEK et al., 2001; REHM et al., 2005). Portanto, tendo menor número de fibroblastos, uma menor expressão de MMP-1 é esperada, como foi observado no presente trabalho.

Nos grupos com mola ortodôntica, foi encontrada uma diminuição da expressão da MMP-1 nos grupos tratados com antiinflamatórios, em relação ao grupo controle, nos dias 1, 3, 5 e 7, não apresentando diferença estatisticamente significativa no dia 14. Retamoso et al. (2010) verificaram, com o método picosirius em ratos, que no 3º dia de movimento dentário induzido, o diclofenaco de potássio causou atraso na maturação do colágeno, retornando aos níveis normais do dia 7 ao 14. Os AINEs e AIEs inibem, ao mesmo tempo, tanto os mediadores pró-inflamatórios (IL-1, TNF- α e PGEs) que estimulam a expressão da MMP-1, quanto os fatores de crescimento (TGF- β) que, provavelmente, estimulam os fibroblastos a produzir colágeno. O remodelamento do LP durante o movimento dentário requer os eventos de degradação de colágeno pelas MMPs e produção de colágeno pelos fibroblastos de maneira coordenada para permitir a nova posição do dente (TAKAHASHI et al., 2003), portanto o atraso na maturação do colágeno nos primeiros dias de movimento ortodôntico pelo uso de antiinflamatórios pode ser um indício de que a expressão de MMP-1 também pode estar diminuída. Nos grupos sem aplicação de força ortodôntica, não foram encontradas diferenças estatísticas de acordo com o uso de medicamento ou com os dias de tratamento. Isso pode ter acontecido porque durante os remodelamentos fisiológicos normais do LP e do osso alveolar, a degradação e deposição do colágeno ocorrem em ausência de inflamação (ONG et al., 2000).

A dexametasona teve um efeito inibitório na expressão da MMP-1 levemente maior do que o diclofenaco de potássio. Esse fato pode ser explicado pelo mecanismo de ação da dexametasona. Além das PGEs, a dexametasona inibe os leucotrienos, que já mostrou ter influência no movimento dentário (MOHAMMED et al., 1989). Além disso, a inibição dos leucotrienos induz a inibição da produção de colagenases (NOLAN E PICKETT, 1985). Adicionalmente, a dexametasona inibe a expressão da MMP-1 em vários tipos celulares e diminui a síntese de colágeno pelos fibroblastos (KIM et al., 1999; REIS et al., 2008; HAKKI et al., 2009; MARCHIONNI et al., 2010).

Embora os maiores eventos inflamatórios e de remodelação sejam manifestados no LP nos primeiros dias de movimentação dentária (PROFFIT FIELDS E SARVER, 2007), a reabsorção e a neoformação óssea são partes do processo de remodelamento e podem ter contribuído para os níveis totais de

MMP-1 obtidos neste trabalho. No presente estudo, a expressão da MMP-1 foi analisada considerando os lados de tração e compressão juntos. O uso desse tipo de mola ortodôntica produz um nível de inclinação dental e, conseqüentemente, no mesmo lado ocorrerão reações de tração e compressão. Além disso, a expressão de MMP-1 tem sido vista em ambos os lados de tração e compressão em pacientes tratados ortodonticamente (GARLET et al., 2007; BILDT et al., 2009). Embora a extração de RNA tenha sido feita a partir de tecidos dentais e periodontais, considera-se que a maior parte da expressão da MMP-1 encontrada foi devida ao remodelamento do LP e do osso alveolar, especialmente nos grupos tratados com movimentação ortodôntica. Resultados controversos sobre a ação das forças ortodônticas na polpa têm sido encontrados (MOSTAFA et al., 1980; SUBAY et al., 2001).

A extrapolação dos resultados mencionados anteriormente em ratos relativos à ação de AINEs e AIEs na expressão gênica da MMP-1 em humanos pode ser: i) o uso de antiinflamatórios pode retardar o remodelamento dentário ortodôntico em períodos iniciais de aplicação da força ortodôntica; ii) o retardo no remodelamento da matriz extracelular pode requerer um tempo de tratamento mais longo.

Devido ao aumento da procura por tratamento ortodôntico e porque muitos pacientes fazem uso de medicamentos antiinflamatórios para o tratamento de doenças crônicas, o ortodontista deve informar os seus pacientes sobre os possíveis efeitos adversos dos antiinflamatórios no tratamento ortodôntico. É recomendável que a anamnese ortodôntica contenha questões sobre doenças crônicas e agudas e sobre a administração de medicamentos, e as consultas para ativação do aparelho ocorram em intervalos maiores nos pacientes que fazem uso crônico de antiinflamatórios não-esteróides e esteróides.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados, pode-se concluir que:

- 1) A aplicação de força ortodôntica levou ao aumento significativo nos níveis de transcritos gênicos da MMP-1 nos dias 1, 3, 5, 7 e 14.
- 2) O diclofenaco de potássio e a dexametasona tiveram efeito inibitório na expressão gênica da MMP-1 nos dias 1, 3, 5 e 7 de aplicação da força ortodôntica.

REFERÊNCIAS

1. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001 Mar;119(3):307-12.

2. Allen DG, Pringle JK, Smith DA. Handbook of Veterinary Drugs. Philadelphia: Lippincott - Raven, p.866, 2nd ed. 1998.
3. Baek SJ, Kim KS, Nixon JB, Wilson LC, Eling TE. Cyclooxygenase Inhibitors Regulate the Expression of a TGF- β Superfamily Member That Has Proapoptotic and Antitumorigenic Activities. *Mol Pharmacol*. 2001 Apr;59(4):901-908.
4. Bildt MM, Bloemen M, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod*. 2009 Oct;31(5):529-35.
5. Birkedal-Hansen H. The role of MMP in human periodontal disease. *J Periodont*. 1993 May;64(5 Suppl):474-84.
6. 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.
7. Botting RM. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J Physiol Pharmacol*. 2006 Nov;57 (Suppl 5):113-124.
8. Cantarella G, Cantarella R, Caltabiano M, Risuglia N, Bernardini R, Leonardi R. Levels of matrix metalloproteinases 1 and 2 in human gingival crevicular fluid during initial tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006 Nov;130(5):568.e11-6.
9. 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): 311–318.
10. 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.
11. Garlet TP, Coelho U, Silva JS, Garlet GP. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J Oral Sci*. 2007 Oct; 115(5): 355-362.

12. Gonzales C, Hotokezaka H, Matsuo K, Shibazaki T, Yozgatian JH, Darendeliler MA, Yoshida N. Effects of steroidal and nonsteroidal drugs on tooth movement and root resorption in the rat molar. *Angle Orthod.* 2009 Jul;79(4):715-26.
13. Hakki SS, Hakki EE, Nohutcu RM. Regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by basic fibroblast growth factor and dexamethasone in periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2009 Dec;44(6):794-802.
14. Kehoe MJ, Cohen SM, Zarrinnia K, Cowan A. The effect of acetaminophen, ibuprofen, and misoprostol on prostaglandin E2 synthesis and the degree and rate of orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 1996;66(5):339-49.
15. Kim CH, Cheng SL, Kim GS. Effects of dexamethasone on proliferation, activity, and cytokine secretion of normal human bone marrow stromal cells: possible mechanisms of glucocorticoid-induced bone loss. *J Endocrinol.* 1999 Sep;162(3):371-9.
16. Kim CH, Park YG, Noh SH, Kim YK. PGE2 induces the gene expression of bone matrix metalloproteinase-1 in mouse osteoblasts by cAMP-PKA signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Feb;37(2):375-85.
17. 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.
18. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006 Apr;129(4):469e.1-460e.32.
19. Lee T, Lee K, Baik H. Expression of IL-1, MMP-9 and TIMP-1 on the Pressure Side of Gingiva under Orthodontic Loading. *Angle Orthod.* 2009 Jul;79(4):733-739.
20. Leonardi R, Talic N F, Loreto C. MMP-13 (collagenase 3) immunolocalisation during initial orthodontic tooth movement in rats. *Acta Histochem.* 2007 Mar;109(3):.215-220.

21. Long P, Liu F, Piesco NP, Kapur R, Agarwal S. Signaling by mechanical strain involves transcriptional regulation of proinflammatory genes in human periodontal ligament cells in vitro. *Bone*. 2002 Apr;30(4):547-52.
22. Luo JC, Shin VY, Liu ES, So WH, Ye YN, Chang FY, Cho CH. Non-ulcerogenic dose of dexamethasone delays gastric ulcer healing in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Nov;307(2):692-8.
23. Marchionni AM, Medrado AP, Silva TM, Fracassi LD, Pinheiro AL, Reis SR. Influence of laser (λ 670 nm) and dexamethasone on the chronology of cutaneous repair. *Photomed Laser Surg*. 2010 Oct;28(5):639-46.
24. Meikle MC, Sellers A, Reynolds JJ. Effect of Tensile Mechanical Stress on the Synthesis of Metalloproteinases by Rabbit Coronal Sutures in vitro, *Calcif Tissue Int*. 1980;30(1):77-82.
25. Mohammed AH, Tatakis DN, Dziak R. Leukotrienes in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1989 Mar;95(3):231-7.
26. Mostafa YA, Iskander KG, El-Mangoury NH. Iatrogenic pulpal reactions to orthodontic extrusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1991 Jan;99(1):30-4.
27. Nishikawa M, Yamaguchi Y, Yoshitake K, Saeki Y. Effects of TNF α and prostaglandin E₂ on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2002 Jun;37(1):167-76.
28. Nolan JC, Pickett WC. Studies on the effects of cyclo-oxygenase and lipoxygenase inhibitors on the macrophage stimulated synthesis of collagenase by rabbit chondrocytes. *Agents Actions*. 1985 Oct;17(1):73-6.
29. Omoigui S. *The pain drugs handbook*. Mosby: St Louis. p. 603, 1st Ed, 1995.
30. Ong C K, Walsh L I, Harbrow D, Taverne A A, Symons A I. Orthodontic tooth movement in the prednisolone-treated rat. *Angle Orthodontics* 2000 Apr; 70(2):118-125.
31. Proffit WR, Fields HW, Sarver DM. *The Biologic Basis of Orthodontic Therapy: Contemporary Orthodontics*. 4rd ed. St Louis, Mo: CV Mosby; 2007.
32. Redlich M, Reichenberg E, Harari D, Zaks B, Shoshan S, Palmon A. The effect of mechanical force on mRNA levels of collagenase, collagen type I, and tissue

- inhibitors of metalloproteinases in gingivae of dogs. *J Dent Res* 2001 Dec;80(12):2080-4.
33. Reis SR, Medrado AP, Marchionni AM, Figueira C, Fracassi LD, Knop LA. Effect of 670-nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. *Photomed Laser Surg*. 2008 Aug;26(4):307-13.
34. Reitan K. Biomechanical principles and reactions. In: Graber TM, Swain BF, editors. *Current orthodontic concepts and techniques*, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co;1985.
35. Retamoso LB, da Cunha Tde M, Knop LA, Shintcovsk RL, Tanaka OM. Organization and quantification of the collagen fibers in bone formation during orthodontic tooth movement. *Micron*. 2009 Dec;40(8):827-30.
36. 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.
37. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids— new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*. 2005 Oct;353(16):1711–1723.
38. Rygh P, Bowling K, Hovlandsdal L, Williams S. Activation of the vascular system: a main mediator of periodontal fiber remodeling in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod*. 1986 Jun;89(6):453-68.
39. 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 Ortho Dentofac Orthop*. 1991 Mar; 99(3):226-240.
40. Sakaki H, Matsumiya T, Kusumi A, Imaizumi T, Satoh H, Yoshida H, Satoh K, Kimura H. Interleukin-1b induces matrix metalloproteinase-1 expression in cultured human gingival fibroblasts: role of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2. *Oral Dis*. 2004 Mar;10(2):87-93.
41. Subay RK, Kaya H, Tarim B, Subay A, Cox CF. Response of human pulpal tissue to orthodontic extrusive applications. *J Endod*. 2001 Aug;27(8):508-11.
42. Swanson C, Lorentzon M, Conaway HH, Lerner UH. Glucocorticoid regulation of osteoclast differentiation and expression of receptor activator of nuclear factor-

- kappaB (NFkappaB) ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappaB in mouse calvarial bones. *Endocrinology*. 2006 Jul;147(7):3613-22.
43. Takahashi I, Nishimura M, Onodera K, Bae JW, Mitani H, Okazaki M, Sasano Y, Mitani H. Expression of MMP-8 and MMP-13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. *J Dent Res*. 2003 Aug;82(8):646-51.
44. Ten Cate AR, Deporter DA, Freeman E. The role of fibroblasts in the remodeling of periodontal ligament during physiologic tooth movement. *Am J Orthod*. 1976 Feb; 69(2):155-167.
45. Waddington RJ, Embery G. Proteoglycans and orthodontic tooth movement. *J Orthod*. 2001 Dec;28(4):281-90.
46. Welgus HG, Jeffrey JJ, Eisen AZ. Human skin fibroblast collagenase. Assessment of activation energy and deuterium isotope effect with collagenous substrates. *J Biol Chem*. 1981 Sep;256(18):9516–9521.
47. Xiang J, Li C, Dong W, Cao Z, Liu L. Expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-2 and extracellular metalloproteinase inducer in human periodontal ligament cells stimulated with interleukin-1 beta. *J Periodontal Res*. 2009 Dec;44(6):784-93
48. Yamauchi M, Katz EP, Mechanic GL. Intermolecular cross-linking and stereospecific molecular packing in type I collagen fibrils of the periodontal ligament. *Biochemistry*. 1986 Aug;25(17):4907-13.
49. Yang G, Im HJ, Wang JHC. Repetitive mechanical stretching modulates IL-1 β induced COX-2, MMP-1 expression, and PGE2 production in human patellar tendon Fibroblasts. *Gene*. 2005 Dec;363(19): 166–172.

FIGURAS



Fig. 1 Foto oclusal da mola ortodôntica instalada.

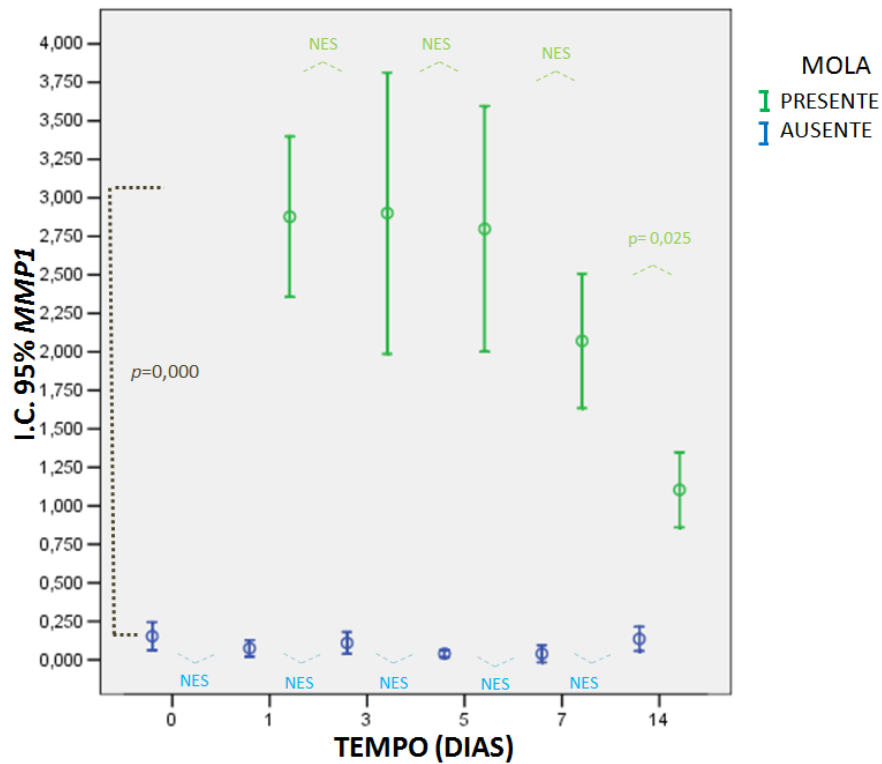


Fig. 2 Expressão quantitativa da MMP-1 analisada nos grupos com e sem mola ortodôntica, estratificados por dias de tratamento, mas não pelo uso de fármaco. Linha pontilhada verde indica o valor p comparando os dias 1 vs 3, 3 vs 5, 5 vs 7 e 7 vs 14 nos grupos com mola ortodôntica. Linha pontilhada azul indica o valor p entre os grupos sem mola ortodôntica. Linha pontilhada vertical cinza indica o valor p entre os grupos com e sem mola ortodôntica em todos dias de tratamento (mesmo valor foi encontrado em todos dias de tratamento $p=0,000$). Os resultados são apresentados com os níveis de MMP-1 normalizados pela β -actina.

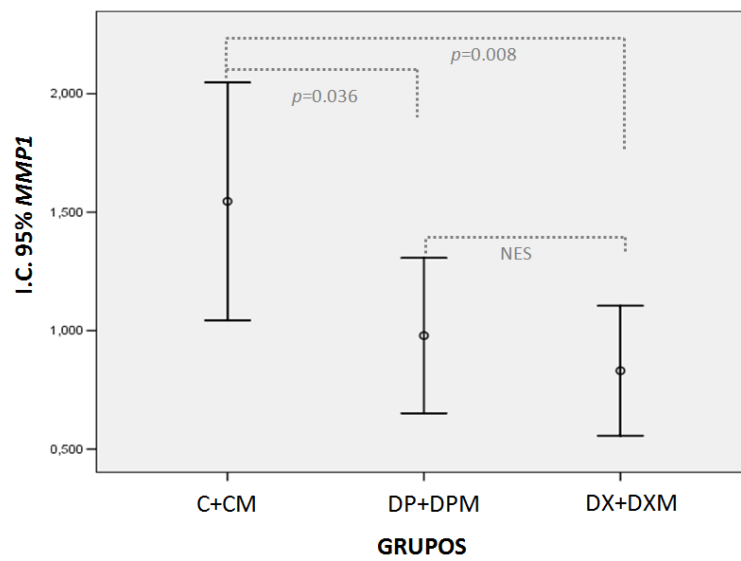


Fig. 3 Expressão quantitativa de MMP-1, considerando o uso de fármacos, não estratificado pela presença ou ausência de mola e dias de tratamento. Linha pontilhada indica o valor p entre os grupos. Os resultados são apresentados com os níveis de MMP-1 normalizados pela β -actina.

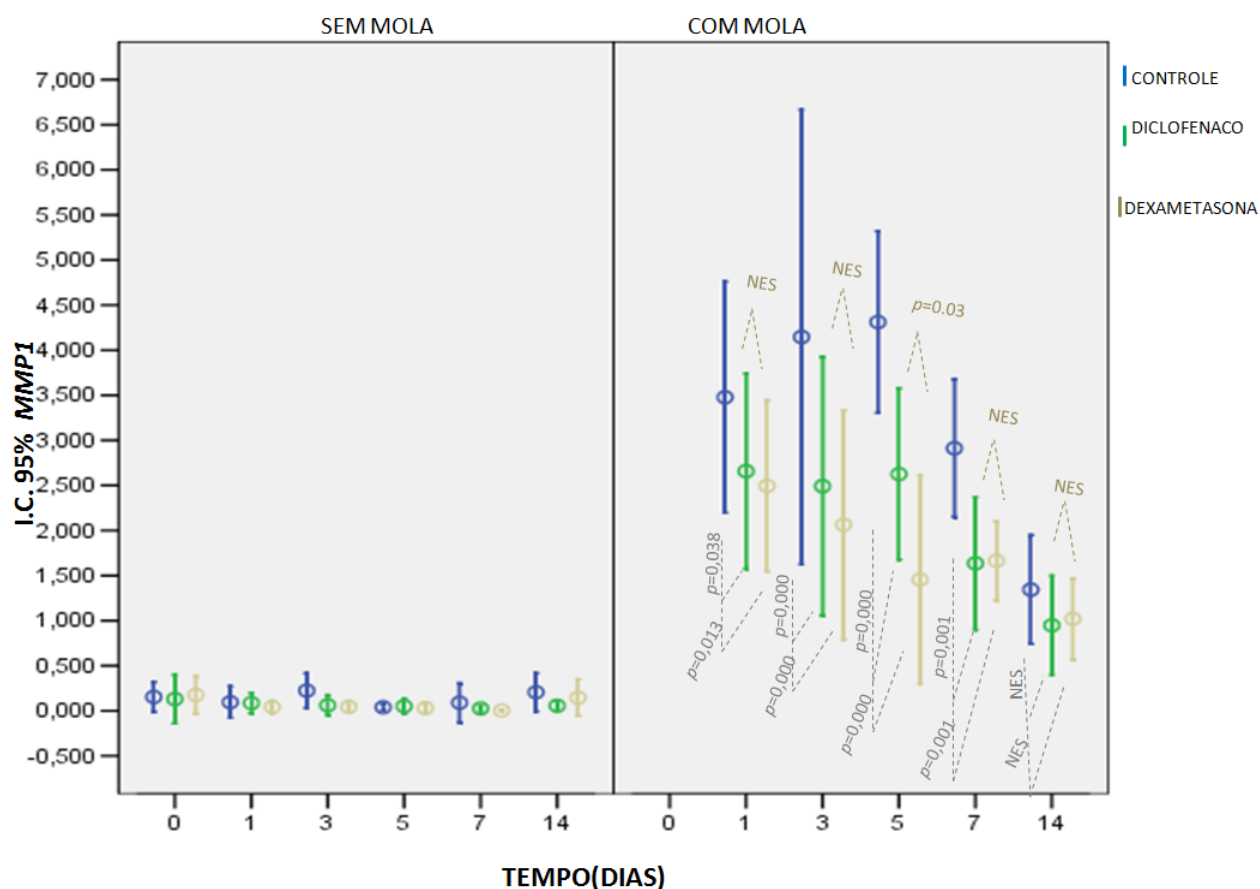


Fig. 4 Expressão quantitativa da MMP-1 entre os grupos sem mola (quadro da esquerda) e entre os grupos com mola (quadro da direita) estratificados por: i) uso de fármacos; ii) tempo de tratamento. Nos grupos sem ação da mola não houve diferença estatisticamente significativa entre medicamentos ou entre os dias de tratamento. Nos grupos com ação da mola a linha pontilhada cinza indica o valor p entre controle vs diclofenaco e dexametasona. Linha pontilhada marrom indica o valor p entre diclofenaco e dexametasona. Os resultados são apresentados com os níveis de MMP-1 normalizados pela β -actina.

2 ARTIGO EM INGLÊS

ABSTRACT

THE EFFECT OF POTASSIUM DICLOFENAC AND DEXAMETHASONE ON MMP-1 GENE TRANSCRIPT LEVELS DURING EXPERIMENTAL TOOTH MOVEMENT IN RATS

Background: MMP-1 is an important enzyme to the periodontal tissue remodeling during orthodontic tooth movement. Steroid (SAID) or non-steroidal (NSAID) anti-inflammatory drugs are used for the treatment of chronic diseases by orthodontic patients, which could influence MMP-1 expression, and in turn the orthodontic tooth movement. **Objective:** To analyze the MMP-1 transcript levels in the periodontal tissues of rats orthodontically treated under effect of potassium diclofenac and dexamethasone at different stages of tooth movement. **Methods:** 50 cN was applied in ninety (n=90) male *Wistar* rats with a closed nickel-titanium coil spring to move the upper right first molars mesially. One group received daily doses of 0.9% saline solution; a second group received daily doses of 5 mg/kg diclofenac potassium and a third group received daily doses of 0.5 mg/kg dexamethasone. MMP-1 gene transcript levels were evaluated by RT-PCR and the results compared between groups by three way ANOVA, with a significance level of 0.05. **Results:** The transcript levels were increased in groups that received the coil spring at all days of the experiment. Considering the use of NSAID and SAID drugs, it was observed a decreased of MMP-1 expression in potassium diclofenac groups with orthodontic movement and dexamethasone groups with orthodontic movement compared with control groups, at days 1, 3, 5 and 7, presenting no significance at day 14. **Conclusion:** The application of orthodontic forces led to a significant increase in MMP-1 gene transcripts. The use of anti-inflammatory drugs delayed orthodontic tooth remodeling by down-regulating of MMP-1 expression in the initial periods of orthodontic force application, which might make the treatment time longer.

Key-words: Potassium diclofenac; Dexamethasone; Orthodontic movement; MMP-1.

INTRODUCTION

Orthodontic treatment occurs when prolonged force is applied on tooth and it is characterized by remodeling changes in periodontal tissues around the moving teeth, including periodontal ligament (PDL) and alveolar bone (KRISHNAN AND DAVIDOVITCH, 2006). The exposition to degrees of magnitude, frequency, and duration of mechanical loading expresses extensive structural and biochemical changes, firstly in the periodontal ligament (PDL) region (PROFFIT, FIELDS AND SARVER, 2007). Then, the remodeling in the surrounding tissues can take place. The transduction of these mechanical forces to the cells triggers a biologic response, which has been described as an aseptic inflammation (GARLET et al., 2007).

The initial phase of orthodontic tooth movement usually involves vascular changes and migration of leucocytes out of the PDL capillaries, leading to cellular activation, followed by the synthesis and liberation of biologically active substances, such as enzymes, prostaglandins, cytokines and growth factors within the periodontium (ALHASHIMI et al., 2001; GARLET et al., 2007). Previous researches have suggested that such mediators play an important role in periodontal remodeling that is dependent, among other factors, on the degradation and apposition of extracellular matrix (ECM) (REITAN, 1985).

Orthodontic tooth movement, in which forces exerted on the tooth are transmitted to the surrounding tissues of the periodontium, plays an integral role on remodeling of the ECM (WADDINGTON AND EMBERY, 2001), whose major components are type I and III collagens (YAMAUCHI et al., 1986). The force application disrupts the equilibrium that exists between collagen synthesis and degradation (LEONARDI et al., 2007) by means of a class of proteolytic enzymes, named matrix metalloproteinases (MMPs), which significantly contributes to regulate the remodeling of periodontal tissues (WELGUS WELGUS, JEFFREY AND EISEN, 1981; BIRKEDAL-HANSEN, 1993). MMP-1, MMP-8 and MMP-13 comprise the collagenase subfamily of MMPs in humans. Collagenases are the only members of the family of MMPs that degrade native fibrillar collagen types I, II and III (LEONARDI et al., 2007). These proteases are produced by a variety of cell

types, including fibroblasts, osteoblasts and endothelial cells (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

Orthodontic tooth movement may be influenced by general and local administration of pharmaceutical agents (KEHOE et al., 1996; DE CARLOS et al., 2006; GONZALES et al., 2009). Potassium diclofenac is a nonsteroidal anti-inflammatory (NSAID) drug that inhibits cyclooxygenase-1 and 2 (COX-1 and 2) (BAEK et al., 2001), blocking the formation of prostaglandins (PGEs) from arachidonic acid, decreasing the inflammatory response by inhibiting interleukins (ILs) and tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) (BOTTING, 2006). Dexamethasone is a potent steroid anti-inflammatory (SAID) that inhibits PGEs and leukotriene (LT) release through A2 phospholipase down-regulation (LUO et al., 2003), altering growth factors activity (SWANSON et al., 2006) and inhibiting production and activity of interleukins (RHEN et al., 2005).

Therefore, due to i) the increasing demand for orthodontic treatment; ii) many patients make use of chronic doses of NSAIDs and SAIDs for treatment of systemic and local diseases, and iii) pro-inflammatory mediators play a key role on MMP regulation, the hypothesis of this study is that the administration of anti-inflammatory drugs has an effect on the expression of MMP-1 during the orthodontic treatment. Thus, the aim of this study was to investigate the MMP-1 transcript levels in the periodontal tissues of rats orthodontically treated under action of potassium diclofenac and dexamethasone drugs at different stages of tooth movement.

MATERIAL AND METHODS

Experimental animals, orthodontic tooth movement, and tissue preparation

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 n° 507.

The orthodontic movement was produced by a nickel-titanium (NiTi) closed-coil spring (3M Unitek, ref. 344-150, California, CA), that applied a continuous force of 50 cN magnitude (GONZALES et al., 2009) to move mesially the maxillary right molar (Fig. 1). The appliance set has been previously described (ALHASHIMI et al., 2001; GONZALES et al., 2009). The force was measured using a Dynamometer gauge (Dentaurum, number 1005004, Ispringen, Germany). 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 right first molars of all rats received the orthodontic appliance and were divided into groups: CM (control with orthodontic movement), PDM (potassium diclofenac with orthodontic movement), and DXM (dexamethasone with orthodontic movement). The left first molars were not given any force and served as the contralateral control side, according to ONG et al. (2000), BLETSA et al. (2006) and LEE et al. (2009), and were divided into groups: C (control, without orthodontic movement), PD (potassium diclofenac control without orthodontic movement), and DX (dexamethasone control without orthodontic movement). Each of the experimental groups was subdivided in 0, 1, 3, 5, 7 and 14 days of tooth movement (5 rats per subgroup). There was no reactivation during the experimental period.

The animals in the C and CM groups received daily doses of 0.9%, saline solution intramuscularly to simulate injection stress. In the PD and PDM groups, the rats received daily doses (5 mg/kg) of potassium diclofenac (Cataflam®, Lab.

Novartis Biociências, São Paulo-SP, Brazil) by intramuscular injection (KRISCHAK GD et al., 2007; RETAMOSO et al., 2010). Finally, the DX and DXM groups received daily doses (0.5 mg/kg) of dexamethasone (Decadron®, Achè Lab S.A., Guarulhos-SP, Brazil), intramuscularly (OMOIGUI S, 1995; ALLEN, PRINGLE AND SMITH, 1998). The drug application started five days before the coil spring installation in all groups.

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 maxillae were 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 (real-time PCR)

The samples were immediately mechanically macerated in a bowl with a pestle until the whole bone and tooth powder were processed. Total RNA from the powder obtained was extracted using the TRIzol® (Invitrogen, California, CA) reagent, following the protocol recommended by the manufacturer and the complementary DNA (cDNA) was synthesized using 3 µg of RNA through a reverse transcription reaction (Superscript III; Invitrogen, Carlsbad, CA), as previously described (CARDOSO et al., 2008). 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, and normalized by the tissue weight. Negative controls without cDNA or

DNA, 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). Three way ANOVA test was used to compare differences in the mean values of the variable MMP-1 transcript levels between the groups Control (C+CM), Potassium diclofenac (PD+PDM), Dexamethasone (DX+DXM), 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 for heterogeneous variance was used to identify intergroup differences, with a significance level of 0.05.

RESULTS

When the expression of MMP-1 was analyzed in the groups with and without coil spring, stratified by days of treatment, but not by drug use (Fig. 2), it was found that the levels of MMP-1 transcripts were significantly augmented in the groups with orthodontic appliance at all days of treatment. Between the groups with presence of coil spring, it was found similar MMP-1 expression at days 1, 3, 5, and 7. However, at day 7 the levels of expression started to decrease, being at day 14 the lowest degree of expression ($p < 0.05$) (Fig. 2). Also, there was no statistically significant difference (NSD) between the groups without coil spring (Fig. 2).

Considering the use of NSAID and SAID drugs, non stratified by presence or absence of coil spring and days of treatment (Fig. 3), it was observed statistically significant difference (SSD) between control versus potassium diclofenac groups ($p = 0.036$), and control versus dexamethasone groups ($p = 0.008$), while there was NSD between dexamethasone and potassium diclofenac ($p = 0.582$), being higher levels found in the control groups.

When the samples were stratified by the three variables: i) coil spring presence or absence, ii) drugs use, and iii) time of treatment (Fig. 4), the MMP-1 expression presented SSD at days 1, 3, 5 and 7 in the groups CM vs PDM and CM vs DXM, while at day 5 there was SSD too in the group PDM vs DXM. Finally, at day 14, there was NSD between CM, PDM, and DXM groups (Fig. 4). There was SSD in MMP-1 transcript levels between groups with and without coil spring at all days of treatment. Also, there was NSD between the groups without coil spring (Fig. 4).

DISCUSSION

This cross-sectional case-control study examined the MMP-1 transcript levels in the dental and periodontal tissues of *Wistar* rats, with and without orthodontic force application, under action of potassium diclofenac and dexamethasone drugs at different stages of tooth movement.

Mechanical force appears to evoke structural and biomechanical changes in fibroblasts that, in response, actively degrade and synthesize collagen (TEN CATE et al., 1976), release cytokines (SAITO et al., 1991), and produce MMPs (MEIKLE et al., 1980). Generally, the expression of MMP-1 is regulated by pro-inflammatory cytokines, such as PGEs, ILs, and TNF- α (NISHIKAWA et al. 2002; SAKAKI et al., 2004; KIM et al., 2005; XIANG et al., 2009), being their expression in turn regulated by mechanical strain (LONG et al., 2002; YANG et al., 2005).

In this study, it was observed increased levels of MMP-1 gene transcripts in the groups under orthodontic forces compared to groups without force application at all days of the experiment. These data are in accordance to REDLICH et al. (2001) study in dogs, which found that orthodontic force significantly increase mRNA levels of MMP-1 and after the removal of such a force, MMP-1 gene expression was significantly decreased. This concept is supported by human *in vivo* studies on teeth subjected to orthodontic treatment that showed increased MMP-1 levels after force application (CANTARELLA et al., 2006; GARLET et al., 2007; BILDT et al., 2009).

In the groups with coil spring (considering groups with and without drug use), when stratified by days of treatment, it was found increased and similar MMP-1 expression at days 1, 3, 5, and 7. However, at day 7 the levels of expression started to decrease, being at day 14 the lowest degree of expression. As previously discussed, since there is a stimulatory synergistic effect of mechanical loading, cytokines and secretion of MMP-1, we suggest that the transient increased expression of MMP-1 during the first 7 days may have been regulated via cytokines, either directly or indirectly. ALHASHISMI et al. (2001) demonstrated that the maximal level of IL-1 β expression was detected at day 3 after the application of orthodontic force. The decreased levels of IL-1 β were at

days 7 and 10. Moreover, the coil spring did not require reactivation during the experiment. This fact may explain the reason that MMP-1 levels were decreased at day 14. Furthermore, RETAMOSO et al. (2009) observed that at 3rd day of orthodontic tooth movement in rats, collagen was deposited as thin fibrils. At day 7, an intermediate level of organization was observed and at day 14 bone matrix was composed entirely of mature collagen. Since the PDL fibers were damaged by mechanical stress generated by orthodontic force (RYGH et al., 1986), it seems likely that, during tooth movement, this physically broken collagen is degraded and reconstructed coordinately, in the process of tissue repair (TAKAHASHI et al., 2003). Therefore, at day 3 the presence of MMP-1 may be more requested than at days 7 and 14 to degrade the ancient collagen fibers, allowing the collagen renew and reorganization to the new teeth position. It is worth mentioning that, these findings were observed in the groups with coil spring including both groups (with and without drugs use), being the expression potentially lower due to the anti-inflammatory effect.

NSAIDs and SAIDs act inhibiting COX-1 and 2, blocking the formation of PGEs from arachidonic acid (BAEK et al., 2001; REHM et al., 2005) and decreasing cytokine expression (REHM et al., 2005; BOTTING, 2006). Potassium diclofenac and dexamethasone had effect on expression of MMP-1 during the orthodontic treatment in this experiment. The levels of MMP-1 transcripts decreased in groups orthodontically treated under drugs use, demonstrating the potential of inhibition of these drugs on MMP-1 gene expression during the orthodontic tooth movement. As MMP-1 expression is regulated by IL-1, TNF- α , and PGEs, we suggest that NSAIDs and SAIDs, by inhibiting these cytokines, will thus inhibit MMP-1. Moreover, NSAID and SAID administration is related to lower levels of growth factor- β (TGF- β), responsible for fibroblast proliferation (BAEK et al., 2001; REHM et al., 2005). Then, having decreased the number of fibroblasts, less MMP-1 synthesis would be expected.

In the groups with coil spring, it was observed that *MMP-1* expression decreased in groups which were treated with drugs at days 1, 3, 5, and 7, presenting no significance at day 14. RETAMOSO et al. (2010) found, with the picosirius method in rats, that on the 3rd day of induced tooth movement, the potassium diclofenac caused delay of collagen maturation, returning to optimum

levels from day 7 to 14. Since the MMP-mediated remodeling of the PDL during tooth movement could require expression of collagen genes coordinately to permit the new teeth position (TAKAHASHI et al., 2003), the delayed formation of collagen fibers at the initial days of orthodontic treatment by the use of anti-inflammatory drugs may indicate a decrease in MMP-1 expression, as the anabolic and catabolic events should occur coordinately to permit the moving teeth to establish a new position in alveolar the bone. In the groups without coil spring, no differences were observed according to drugs use or to the time of treatment. This may happen because during normal physiological PDL and bone remodeling, collagen degradation and deposition occur in absence of inflammation (ONG et al., 2000).

Dexamethasone had an inhibitory effect slightly increased than potassium diclofenac in the groups that underwent orthodontic treatment. This fact can be explained by the mechanism of action of dexamethasone. Besides PGEs, dexamethasone inhibits leukotriens, which were already shown to influence the orthodontic movement (MOHAMMED et al., 1989). Also, leukotriens inhibition has been reported to induce inhibition of collagenase production (NOLAN AND PICKETT, 1985). Additionally, dexamethasone is known to inhibit MMP-1 expression in various cell types and decrease collagen synthesis by fibroblasts (KIM et al., 1999; REIS et al., 2008; HAKKI et al., 2009; MARCHIONNI et al., 2010).

Although the major inflammatory and remodeling events are manifested in the PDL, in the initial days of the orthodontic treatment (PROFFIT FIELDS AND SARVER, 2007), bone resorption and formation are parts of the remodeling process and may contribute to the total amount of MMP-1 levels seen in this study. In this study, the MMP-1 transcript levels were analyzed considering tension and compression sites together. The use of this type of orthodontic appliance produces a degree of dental tip and, consequently, in the same side there will be tension and compression reactions. Furthermore, MMP-1 expression has been seen in both tension and compression tooth sides in orthodontically treated patients (GARLET et al., 2007; BILDT et al., 2009). Additionally, controversial results have been reported about the effect of orthodontic treatment on pulp tissue (MOSTAFA et al., 1980; SUBAY et al., 2001). However, we considered that most of MMP-1

expression seen in this study was due to PDL and alveolar bone remodeling, especially in the groups orthodontically treated.

Extrapolation of the aforementioned results in rats on the action of NSAIDs and SAIDs on MMP-1 gene transcripts to humans could be: i) the use of anti-inflammatory drugs may delayed orthodontic tooth remodeling expression in the initial phase of orthodontic force application; ii) the delay in the extracellular matrix remodeling may require the treatment time longer.

Due to the increasing demand for orthodontic treatment and because many patients make use of chronic doses of NSAIDs and SAIDs for treatment of systemic and local diseases, the orthodontist should inform the patients about possible adverse effects anti-inflammatory drugs on orthodontic treatment. Thus, it may be recommended that the orthodontic anamnesis contains questions about drug administration and the appointment scheduled with longer intervals in those patients.

CONCLUSIONS

It was concluded that application of orthodontic forces lead to a significant increase in MMP-1 gene transcripts. Anti-inflammatory drugs may have an inhibitory effect on the expression of MMP-1 during the initial days of orthodontic force application.

REFERENCES

1. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;119:307-12.
2. Allen DG, Pringle JK, Smith DA. *Handbook of Veterinary Drugs*. Philadelphia: Lippincott - Raver, p.866, 2nd ed. 1998.
3. Baek SJ, Kim KS, Nixon JB, Wilson LC, Eling TE. Cyclooxygenase Inhibitors Regulate the Expression of a TGF- β Superfamily Member That Has Proapoptotic and Antitumorigenic Activities. *Mol Pharmacol* 2001;59:901-908.
4. Bildt MM, Bloemen M, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod* 2009;31:529-35.
5. Birkedal-Hansen H. The role of MMP in human periodontal disease. *J Periodont* 1993;64:474-84.
6. 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;114:423-9.
7. Botting RM. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J Physiol Pharmacol* 2006;57:113-124.
8. Cantarella G, Cantarella R, Caltabiano M, Risuglia N, Bernardini R, Leonardi R. Levels of matrix metalloproteinases 1 and 2 in human gingival crevicular fluid during initial tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;130:568.e11-6.
9. 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; 84: 311–318.
10. 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;129:402-6.

11. Garlet TP, Coelho U, Silva JS, Garlet GP. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J Oral Sci* 2007; 115: 355-362.
12. Gonzales C, Hotokezaka H, Matsuo K, Shibazaki T, Yozgatian JH, Darendeliler MA, Yoshida N. Effects of steroidal and nonsteroidal drugs on tooth movement and root resorption in the rat molar. *Angle Orthod* 2009;79:715-26.
13. Hakki SS, Hakki EE, Nohutcu RM. Regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by basic fibroblast growth factor and dexamethasone in periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 2009;44:794-802.
14. Kehoe MJ, Cohen SM, Zarrinnia K, Cowan A. The effect of acetaminophen, ibuprofen, and misoprostol on prostaglandin E2 synthesis and the degree and rate of orthodontic tooth movement. *Angle Orthod* 1996;66:339-49.
15. Kim CH, Cheng SL, Kim GS. Effects of dexamethasone on proliferation, activity, and cytokine secretion of normal human bone marrow stromal cells: possible mechanisms of glucocorticoid-induced bone loss. *J Endocrinol* 1999;162:371-9.
16. Kim CH, Park YG, Noh SH, Kim YK. PGE2 induces the gene expression of bone matrix metalloproteinase-1 in mouse osteoblasts by cAMP-PKA signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:375-85.
17. 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;127:453-8.
18. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129:469e.1-460e.32.
19. Lee T, Lee K, Baik H. Expression of IL-1, MMP-9 and TIMP-1 on the Pressure Side of Gingiva under Orthodontic Loading. *Angle Orthod* 2009;79:733-739.
20. Leonardi R, Talic N F, Loreto C. MMP-13 (collagenase 3) immunolocalisation during initial orthodontic tooth movement in rats. *Acta Histochemia* 2007;109:215-220.

21. Long P, Liu F, Piesco NP, Kapur R, Agarwal S. Signaling by mechanical strain involves transcriptional regulation of proinflammatory genes in human periodontal ligament cells in vitro. *Bone* 2002;30:547-52.
22. Luo JC, Shin VY, Liu ES, So WH, Ye YN, Chang FY, Cho CH. Non-ulcerogenic dose of dexamethasone delays gastric ulcer healing in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;307:692-8.
23. Marchionni AM, Medrado AP, Silva TM, Fracassi LD, Pinheiro AL, Reis SR. Influence of laser (λ 670 nm) and dexamethasone on the chronology of cutaneous repair. *Photomed Laser Surg* 2010;28:639-46.
24. Meikle MC, Sellers A, Reynolds JJ. Effect of Tensile Mechanical Stress on the Synthesis of Metalloproteinases by Rabbit Coronal Sutures in vitro, *Calcif Tissue Int* 1980;30:77-82.
25. Mohammed AH, Tatakis DN, Dziak R. Leukotrienes in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1989;95:231-7.
26. Mostafa YA, Iskander KG, El-Mangoury NH. Iatrogenic pulpal reactions to orthodontic extrusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1991;99:30-4.
27. Nishikawa M, Yamaguchi Y, Yoshitake K, Saeki Y. Effects of TNF α and prostaglandin E2 on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res* 2002;37:167-76.
28. Nolan JC, Pickett WC. Studies on the effects of cyclo-oxygenase and lipoxygenase inhibitors on the macrophage stimulated synthesis of collagenase by rabbit chondrocytes. *Agents Actions* 1985;17:73-6.
29. Omoigui S. *The pain drugs handbook*. Mosby: St Louis. p. 603, 1st Ed, 1995.
30. Ong C K, Walsh L I, Harbrow D, Taverne A A, Symons A I. Orthodontic tooth movement in the prednisolone-treated rat. *Angle Orthodontics* 2000; 70:118-125.
31. Proffit WR, Fields HW, Sarver DM. *The Biologic Basis of Orthodontic Therapy: Contemporary Orthodontics*. 4rd ed. St Louis, Mo: CV Mosby; 2007.
32. Redlich M, Reichenberg E, Harari D, Zaks B, Shoshan S, Palmon A. The effect of mechanical force on mRNA levels of collagenase, collagen type I, and tissue inhibitors of metalloproteinases in gingivae of dogs. *J Dent Res* 2001;80:2080-4.

33. Reis SR, Medrado AP, Marchionni AM, Figueira C, Fracassi LD, Knop LA. Effect of 670-nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. *Photomed Laser Surg.* 2008;26:307-13.
34. Reitan K. Biomechanical principles and reactions. In: Graber TM, Swain BF, editors. *Current orthodontic concepts and techniques*, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co;1985.
35. Retamoso LB, da Cunha Tde M, Knop LA, Shintcovsk RL, Tanaka OM. Organization and quantification of the collagen fibers in bone formation during orthodontic tooth movement. *Micron* 2009;40:827-30.
36. 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; 293:195-9.
37. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids— new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 2005;353:1711–1723.
38. Rygh P, Bowling K, Hovlandsdal L, Williams S. Activation of the vascular system: a main mediator of periodontal fiber remodeling in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod* 1986;89:453-68.
39. 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 Ortho Dentofac Orthop* 1991 Mar; 99(3):226-240.
40. Sakaki H, Matsumiya T, Kusumi A, Imaizumi T, Satoh H, Yoshida H, Satoh K, Kimura H. Interleukin-1b induces matrix metalloproteinase-1 expression in cultured human gingival fibroblasts: role of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2. *Oral Dis* 2004;10:87-93.
41. Subay RK, Kaya H, Tarim B, Subay A, Cox CF. Response of human pulpal tissue to orthodontic extrusive applications. *J Endod* 2001;27:508-11.
42. Swanson C, Lorentzon M, Conaway HH, Lerner UH. Glucocorticoid regulation of osteoclast differentiation and expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB (NFkappaB) ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappaB in mouse calvarial bones. *Endocrinology* 2006;147:3613-22.

43. Takahashi I, Nishimura M, Onodera K, Bae JW, Mitani H, Okazaki M, Sasano Y, Mitani H. Expression of MMP-8 and MMP-13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. *J Dent Res* 2003;82:646-51.
44. Ten Cate AR, Deporter DA, Freeman E. The role of fibroblasts in the remodeling of periodontal ligament during physiologic tooth movement. *Am J Orthod* 1976; 69:155-167.
45. Waddington RJ, Embery G . Proteoglycans and orthodontic tooth movement. *J Orthod* 2001;28:281-90.
46. Welgus HG, Jeffrey JJ, Eisen AZ. Human skin fibroblast collagenase. Assessment of activation energy and deuterium isotope effect with collagenous substrates. *J Biol Chem* 1981;256:9516–9521.
47. Xiang J, Li C, Dong W, Cao Z, Liu L. Expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-2 and extracellular metalloproteinase inducer in human periodontal ligament cells stimulated with interleukin-1 beta. *J Periodontal Res* 2009;44:784-93
48. Yamauchi M, Katz EP, Mechanic GL. Intermolecular cross-linking and stereospecific molecular packing in type I collagen fibrils of the periodontal ligament. *Biochemistry* 1986;25:4907-13
49. Yang G, Im HJ, Wang JHC. Repetitive mechanical stretching modulates IL-1 β induced COX-2, MMP-1 expression, and PGE2 production in human patellar tendon Fibroblasts. *Gene* 2005 ; 363: 166–172.

FIGURES



Fig. 1 Intraoral orthodontic appliance.

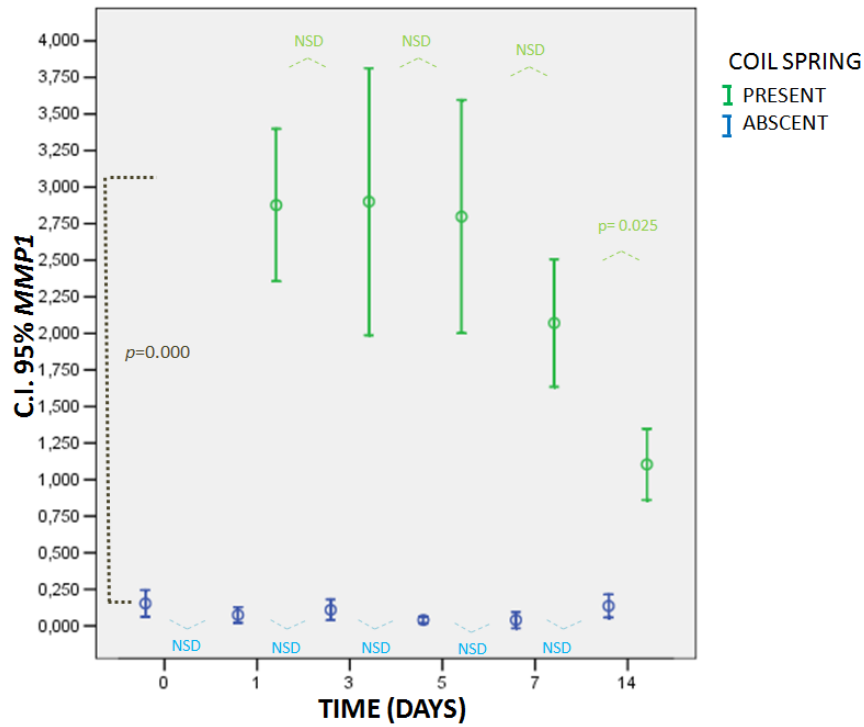


Fig. 2 Quantitative expression of MMP-1 analyzed in the groups with and without coil spring, stratified by days of treatment, but not by drug use. Green dotted lines indicate p -value comparing day 1 vs 3, day 3 vs 5, day 5 vs 7 and day 7vs14 in the groups with coil spring. Vertical gray dotted line indicate p -value between the groups with and without coil spring ($p=0.000$ at all days). Blue dotted lines indicate p -value between the groups without coil spring.

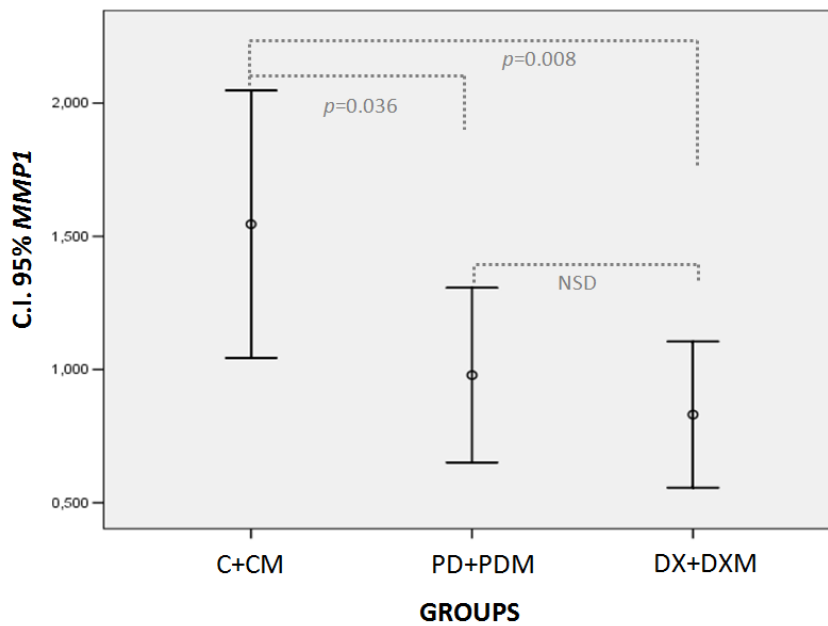


Fig. 3 Quantitative expression of MMP-1, considering the use of NSAID and SAID drugs, no stratified by presence or absence of coil spring and days of treatment. Dotted lines indicate the p -value between groups. The results are presented as the target mRNA level normalized to β -actin, using the cycle threshold (Ct) method.

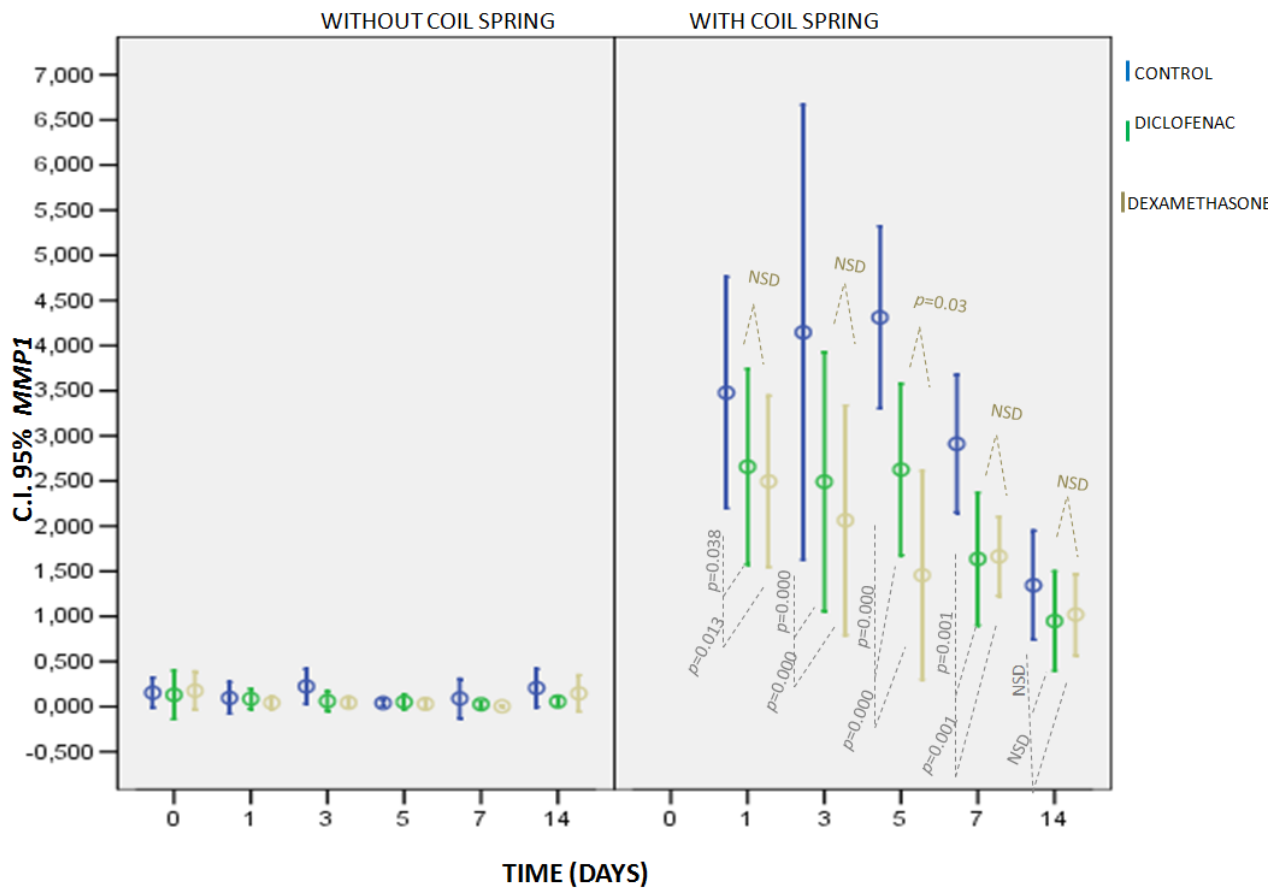


Fig. 4 Quantitative expression of MMP-1 stratified by: i) coil spring presence or absence, ii) drugs use, iii) time of treatment. In the groups without coil spring there was NSD between all groups at all days of treatment. In the groups with coil spring, gray dotted lines indicate p -value between control compared to diclofenac and dexamethasone, and brown dotted lines show p -value between diclofenac and dexamethasone. The results are presented as the target mRNA level normalized to β -actin, using the cycle threshold (Ct) method.

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,


Profª. Gradina Maria D'Almeida e Oliveira
Coordenadora
Comitê de Ética no Uso de Animais - PUCPR

ANEXO B – MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) e registrada sob parecer CEUA - PUCPR nº 507 (Anexo A, página 57).

Foram utilizados 90 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) machos da linhagem *Wistar* com 12 semanas de vida, pesando aproximadamente 300 – 350 g, provenientes do Biotério da PUCPR. Os animais permaneceram acondicionados em caixas de propileno semi-fosco (3 animais / caixa), à temperatura entre 19 °C e 22 °C, com ração e água, fornecidos *ad libitum*. A ração fornecida (Nuvilab CR1 farelada, Paraná, Brasil) foi triturada para evitar fraturas no aparelho. Foi respeitado o fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro para evitar alterações no ciclo metabólico.

O movimento dentário foi induzido por meio de mola fechada de níquel-titânio (3M Unitek, ref. 344-150, Califórnia, CA), que foi descrito previamente (ALHASHIMI et al., 2001; GONZALES et al., 2009). A mola ativada produziu força recíproca entre os incisivos superiores e o primeiro molar superior direito (Fig. 1, página 59; Fig. 2, página 60) com magnitude de 50 cN (GONZALES et al., 2009), mensurada por meio de dinamômetro (Dentaurum, nº 1005004, Ispringen, Alemanha) devidamente calibrado e aferido.

A mola foi instalada nos animais sob anestesia geral, induzida por injeção intramuscular de ketamina (Vetanarcol®, Lab. König S.A., Lote 00103, Avellaneda, Argentina) na dose de 1,8 mg/kg e xilazina (Rompun®, Lab. Bayer, Lote 00404, São Paulo, Brasil) na dose de 1,1 mg/kg.

Os primeiros molares superiores direitos receberam a força ortodôntica e foram divididos em 3 grupos: CM (controle com movimento), DPM (diclofenaco de potássio com movimento) e DXM (dexametasona com movimento). Os primeiros molares superiores esquerdos não receberam força ortodôntica e foram utilizados como controle do lado contralateral (ONG et al., 2000; BLETTSA et al., 2006; LEE et al., 2009), e foram divididos em 3 grupos: C (controle sem movimento), DP (diclofenaco de potássio sem movimento), e DX (dexametasona sem movimento).

Cada um dos grupos experimentais foi subdividido em 0, 1, 3, 5, 7 e 14 dias de movimento dentário (5 ratos por subgrupo). A mola não foi reativada durante o experimento.

Os animais dos grupos C e CM receberam doses diárias de solução salina 0,9% (0,05 mL), via intramuscular, para simular o estresse recebido pelos animais com a injeção. Os animais dos grupos DP e DPM receberam diariamente diclofenaco de potássio (Cataflam®, Novartis Biociências, São Paulo-SP, Brasil), na dose de 5 mg/kg (0,07 mL) (KRISCHAK GD et al., 2007; RETAMOSO et al., 2010), via intramuscular. Finalmente, os animais dos grupos DX e DXM receberam doses diárias de 0,5 mg/kg (0,05 mL) (OMOIGUI S, 1995; ALLEN, PRINGLE e SMITH, 1998) de dexametasona (Decadron®, Achè Lab S.A., Guarulhos-SP, Brazil), via intramuscular. As administrações iniciaram cinco dias antes da instalação da mola em todos os grupos para tentar simular o uso contínuo desses medicamentos pelos pacientes ortodônticos, e prosseguiram ao longo dos períodos de movimentação dentária, realizadas sempre entre 10 e 12 horas da manhã.

Os animais foram mortos após 0, 1, 3, 5, 7 e 14 dias de movimentação ortodôntica, ao término do período experimental, por sobredose de solução anestésica (Ketamina, 5,4 mg/kg). As cabeças foram dissecadas e a região do 1º molar superior direito e esquerdo com o seu periodonto adjacente foram removidas, na forma de bloco, todos de mesmo tamanho. Para padronizar o corte dos blocos, foi realizado um piloto, e todos os cortes foram feitos sempre pelo mesmo operador.

Extração do RNA e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

Os blocos foram imediatamente triturados mecanicamente com auxílio de grau e pistilo esterilizados até que todo o osso e dente fossem transformados numa massa homogênea. Neste momento, foi adicionado à massa obtida, 1 mL de TRIzol® (Invitrogen, Califórnia, CA), solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, com o objetivo de remover todo o material celular, mantendo a integridade apenas das moléculas de RNA (Fig. 3, página 61). O material homogeneizado foi, então, imediatamente levado para congelamento a -80 °C.

Num segundo momento, as amostras foram descongeladas e foram aguardados 5 minutos em temperatura ambiente (15-30°C). Alíquotas de 0,2 mL de clorofórmio foram adicionadas em cada amostra e as misturas foram invertidas 15 vezes e agitadas em *vórtex* por 15 seg, sendo incubada por 1 min em temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos e as fases aquosas foram transferidas com auxílio de micropipeta para novos microtubos.

O RNA em solução foi precipitado com adição de 0,5 mL de álcool isopropílico, seguido de agitação da solução (invertida 5 vezes) para homogeneizar as soluções e foi incubada por 20 min, a -20 °C.

O material foi centrifugado a 12.000 g por 10 min, sendo os sobrenadantes descartados e os “*pellets*” lavados em etanol 75%. As amostras foram misturadas em *vórtex* e centrifugadas a 12.000 g por 5 min. Os sobrenadantes foram removidos e os “*pellets*” formados foram secos em temperatura ambiente e dissolvidos em 0,4 mL de água livre de RNase (H₂O_{DEPC}), e, a seguir, armazenados a – 80 °C.

O cDNA foi sintetizado usando 3 µg de RNA, através de reação de transcriptase reversa (Superscript III; Invitrogen, Carlsbad, CA) como descrito por CARDOSO et al. (2008). Análise quantitativa de RNA mensageiro (mRNA) através da reação em cadeia da polimerase em tempo real foi realizada utilizando o sistema *Syber Green* (Applied Biosystems, Warrington, UK). *Syber Green PCR MasterMix* (Applied Biosystems), 100 nM de primers específicos, e 2.5 ng de cDNA foram utilizados em cada reação. As seqüências dos primers, a predição dos tamanhos do amplicons, e o anelamento e temperatura de fusão, projetados usando o software *Primerexpress* (Applied Biosystems). As condições-padrão do PCR eram 95 °C (10 min), seguido por 40 ciclos de 94 °C (1 min), e 72 °C (2 min), e pela curva de desnaturação padrão. Para análise do mRNA, o nível relativo da expressão gênica foi calculada em relação à expressão da β-actina utilizando o método Ct (*cycle threshold method*). Para análise do DNA, o nível de expressão gênica foi determinado usando o método Ct e normalizado pelo peso do tecido. Controles negativos sem cDNA ou DNA, e sem transcriptase reversa, também foram realizados.

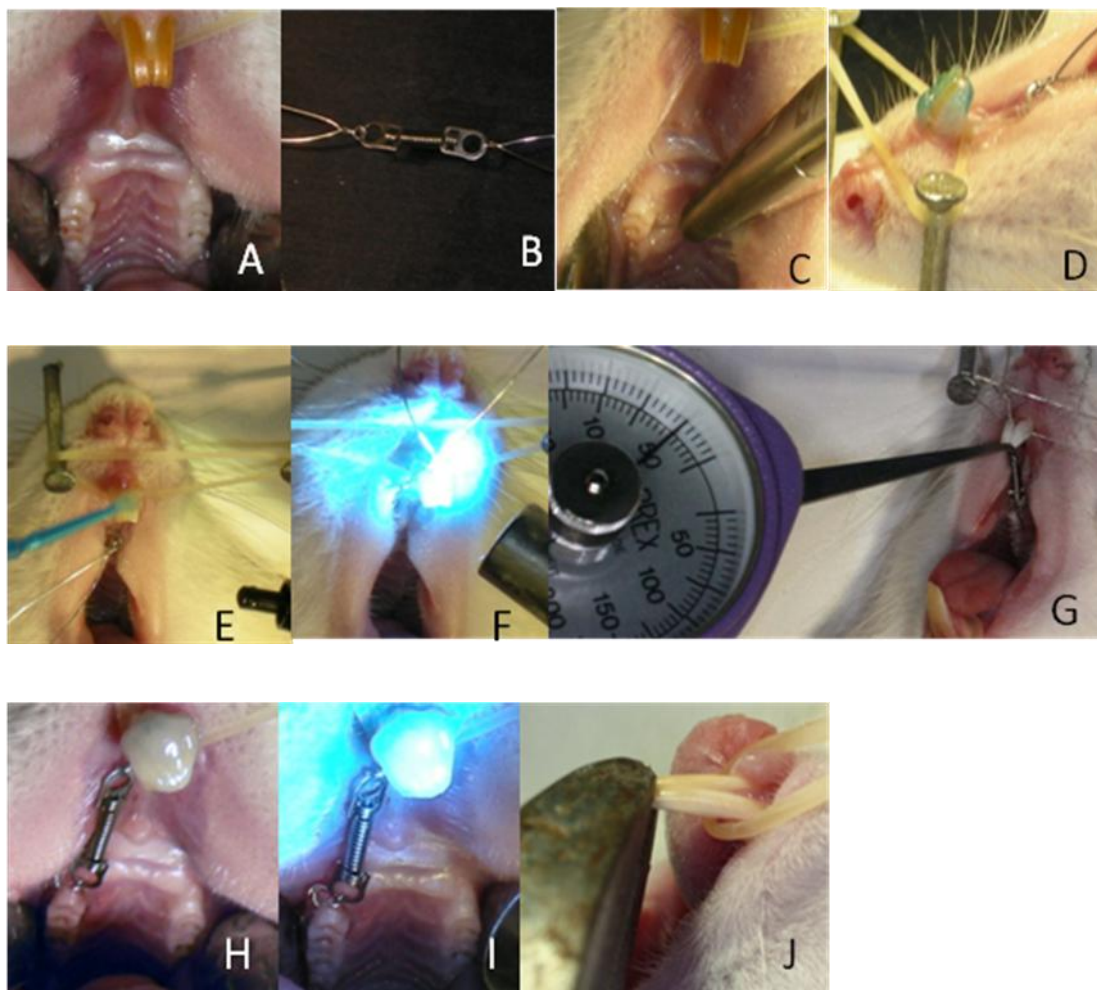


Fig. 1 Fotos da instalação da mola ortodôntica: A-vista oclusal da maxila; B-mola de Ni-Ti fechada com amarrilho 0.20 preso em cada extremidade; C-passagem do amarrilho de uma das extremidades da mola no primeiro molar superior direito para sua apreensão; D-aplicação de ácido nos incisivos superiores, E-aplicação de adesivo nos incisivos superiores; F-fotopolimerização do adesivo; G- ativação da mola (50 cN) e apreensão do amarrilho da outra extremidade da mola nos incisivos superiores; H-aplicação de resina nos incisivos superiores; I- fotopolimerização da resina; J- corte da incisal dos incisivos inferiores.

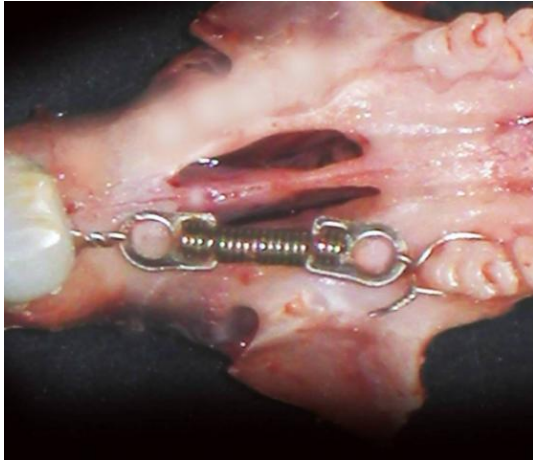


Fig. 2 Foto oclusal da mola ortodôntica instalada.

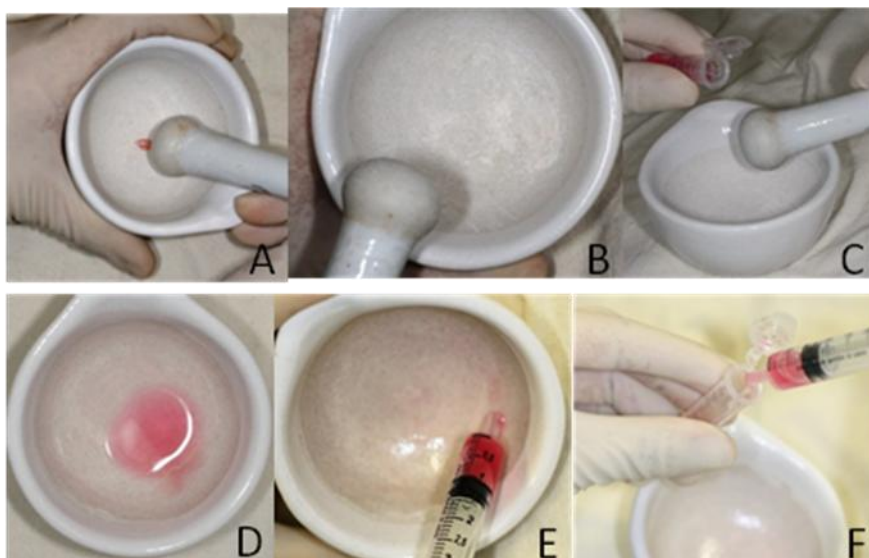


Fig. 3 Sequência da maceração das amostras: A- bloco dentro do grau; B- bloco triturado até uma massa homogênea; C- adição de 1 mL de trizol; D- trizol misturado à massa homogênea; E- remoção de toda a mistura com auxílio de uma seringa; F- adição da mistura no microtubo.

ANEXO C - ANÁLISE ESTATÍSTICA

TABELA 1. Estatística descritiva da variável MMP1, PUCPR-2011.

VARIÁVEL	GRUPOS	N	MÉDIA	DP*	IC de 95% para média		MÍN	MÁX
					limite máximo	limite mínimo		
MMP1	C/Ausente/0	5	0,154	0,134	-0,012	0,320	0,000	0,330
	C/Ausente/1	5	0,096	0,140	-0,078	0,270	0,000	0,310
	C/Ausente/3	5	0,224	0,155	0,032	0,416	0,000	0,410
	C/Ausente/5	5	0,040	0,026	0,007	0,073	0,000	0,070
	C/Ausente/7	5	0,090	0,175	-0,127	0,307	0,000	0,400
	C/Ausente/14	5	0,206	0,169	-0,004	0,416	0,040	0,420
	C/Presente/1	5	3,478	1,032	2,197	4,759	2,180	4,980
	C/Presente/3	5	4,146	2,028	1,628	6,664	0,950	6,360
	C/Presente/5	5	4,312	0,812	3,304	5,320	3,120	5,210
	C/Presente/7	5	2,912	0,613	2,151	3,673	2,330	3,600
	C/Presente/14	5	1,344	0,486	0,740	1,948	0,780	2,110
	DP/Ausente/0	5	0,130	0,217	-0,139	0,399	0,000	0,500
	DP/Ausente/1	5	0,086	0,090	-0,025	0,197	0,000	0,210
	DP/Ausente/3	5	0,061	0,086	-0,046	0,168	0,000	0,200
	DP/Ausente/5	5	0,051	0,067	-0,032	0,134	0,000	0,150
	DP/Ausente/7	5	0,026	0,028	-0,009	0,061	0,000	0,060
	DP/Ausente/14	5	0,056	0,040	0,006	0,106	0,000	0,100
	DP/Presente/1	5	2,658	0,871	1,577	3,739	1,410	3,870
	DP/Presente/3	5	2,492	1,155	1,057	3,927	1,400	4,150
	DP/Presente/5	5	2,626	0,764	1,677	3,575	1,660	3,440
	DP/Presente/7	5	1,636	0,591	0,902	2,370	1,020	2,270
	DP/Presente/14	5	0,948	0,443	0,398	1,498	0,370	1,450
	DX/Ausente/0	5	0,176	0,171	-0,037	0,389	0,000	0,390
	DX/Ausente/1	5	0,042	0,058	-0,031	0,115	0,000	0,120
	DX/Ausente/3	5	0,043	0,049	-0,017	0,104	0,000	0,110
	DX/Ausente/5	5	0,030	0,037	-0,015	0,076	0,000	0,090
	DX/Ausente/7	5	0,004	0,004	-0,002	0,009	0,000	0,010
	DX/Ausente/14	5	0,146	0,163	-0,056	0,348	0,011	0,400
	DX/Presente/1	5	2,494	0,764	1,545	3,443	1,340	3,210
	DX/Presente/3	5	2,064	1,024	0,792	3,336	1,080	3,750
DX/Presente/5	5	1,456	0,930	0,302	2,610	0,480	2,990	
DX/Presente/7	5	1,664	0,352	1,227	2,101	1,340	2,220	
DX/Presente/14	5	1,020	0,362	0,570	1,470	0,620	1,530	

Fonte: dados da pesquisa.

Legenda: (DP*) desvio padrão, (IC) intervalo de confiança, (C) controle, (DP) diclofenaco de potássio (DX) dexametasona, (ausente) mola ausente, (presente) mola presente, (1,3,5,7,14) dias de tratamento

TABELA 2. Análise de variância ANOVA a três critérios, PUCPR-2011.

	F	Valor p	Poder do teste
Grupo	22,48263	0,00000 *	0,99999
Mola	502,9913	0,00000 *	1,00000
Tempodias	8,988824	0,00000 *	0,99987
Grupo vs. Mola	17,99352	0,00000 *	0,99985
Grupo vs. Tempo (dias)	1,352525	0,20947	0,66799
Mola vs. Tempo (dias)	12,42276	0,00000 *	0,99998
Grupo vs. Mola vs. Tempo	1,68321	0,10814	0,71519

Fonte: dados da pesquisa.

Nota: *diferença estatisticamente significativa.

TABELA 3. Teste de homogeneidade de variâncias de Levene para MMP-1 mRNA – Movimento Dentário, PUCPR-2011.

Teste de Levene	df1	df2	Valor p
155,2691653	1	163	0,000

Fonte: Dados da pesquisa.

TABELA 4. Teste de homogeneidade de variâncias de Levene para MMP-1 mRNA – ação do medicamento, PUCPR-2011.

Teste de Levene	df1	df2	Valor p
18,12326927	2	162	0,000

Fonte: Dados da pesquisa.

TABELA 5. Teste de homogeneidade de variâncias de Levene para MMP-1 mRNA – dias de tratamento, PUCPR-2011.

Levene Statistic	df1	df2	Valor p
34,28757882	5	159	0,000

Fonte: dados da pesquisa.

TABELA 6. Teste de homogeneidade de variâncias de Levene para MMP-1 mRNA – mola vs. medicamentos, PUCPR-2011.

Levene Statistic	df1	df2	Valor p
31,64178836	5	159	0,000

Fonte: dados da pesquisa.

TABELA 7. Teste de homogeneidade de variâncias de Levene para MMP-1 mRNA – dias de tratamento vs. mola vs. medicamento PUCPR-2011.

Levene Statistic	df1	df2	Valor p
4,477001836	32	132	0,000

Fonte: dados da pesquisa.

TABELA 8. Valores médios da expressão da MMP1, considerando dia e presença ou ausência de mola nos grupos Controle, Diclofenaco de Potássio e Dexametasona, PUCPR-2011.

Dias	Mola	CONTROLE		DICLOFENACO		DEXAMETASONA	
		Expressão MMP-1	DP	Expressão MMP-1	DP	Expressão MMP-1	DP
0	não	0,154 ^a	0,134	0,130 ^a	0,217	0,176 ^a	0,171
1	não	0,096 ^a	0,140	0,086 ^a	0,090	0,042 ^a	0,058
1	sim	3,478 ^a	1,032	2,658 ^b	0,871	2,494 ^{cb}	0,764
3	não	0,224 ^a	0,155	0,086 ^a	0,090	0,043 ^a	0,049
3	sim	4,146 ^a	2,028	2,492 ^b	1,155	2,064 ^{cb}	1,024
5	não	0,040 ^a	0,026	0,061 ^a	0,086	0,030 ^a	0,037
5	sim	4,312 ^a	0,812	2,626 ^b	0,764	1,456 ^{cb}	0,930
7	não	0,090 ^a	0,175	0,051 ^a	0,067	0,004 ^a	0,004
7	sim	2,912 ^a	0,613	1,636 ^b	0,591	1,664 ^{cb}	0,352
14	não	0,206 ^a	0,169	0,026 ^a	0,028	0,146 ^a	0,163
14	sim	1,344 ^a	0,486	0,948 ^b	0,443	1,020 ^{cb}	0,362

Fonte: dados da pesquisa.

Nota: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante.

Nota 1: Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significante.

Legenda (DP) desvio padrão

TABELA 9. Valores médios da expressão da MMP1 nos grupos C, DP, DX, CM, DPM e DXM em cada dia de tratamento, PUCPR-2011.

	Dia	C	CM	DP	DPM	DX	DXM
MMP1 mRNA	0	0,154 ^a		0,130 ^a		0,176 ^a	
	1	0,096 ^a	3,478 ^b	0,086 ^a	2,658 ^c	0,042 ^a	2,494 ^c
	3	0,224 ^a	4,146 ^b	0,061 ^a	2,492 ^c	0,043 ^a	2,064 ^c
	5	0,040 ^a	4,312 ^b	0,051 ^a	2,626 ^c	0,030 ^a	1,456 ^c
	7	0,090 ^a	2,912 ^b	0,026 ^a	1,636 ^c	0,004 ^a	1,664 ^c
	14	0,206 ^a	1,344 ^b	0,056 ^a	0,948 ^c	0,146 ^a	1,020 ^c

Fonte: dados da pesquisa.

Nota: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante.

Nota 1: Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significante.

Legenda: (C) controle sem mola, (CM) controle com mola, (DP) diclofenaco de potássio sem mola, (DPM) diclofenaco de potássio com mola, (DX) dexametasona sem mola, (DXM) dexametasona com mola.

TABELA 10. Valores médios da expressão da MMP1 durante os dias de tratamento, em cada grupo (C, DP, DX, CM, DPM e DXM), PUCPR-2011.

Grupos		Dias de tratamento					
		0	1	3	5	7	14
MMP-1 mRNA	C	0,154 ^a	0,096 ^a	0,224 ^a	0,040 ^a	0,090 ^a	0,206 ^a
	CM		3,478 ^{ac}	4,146 ^{ab}	4,312 ^b	2,912 ^c	1,344 ^d
	DP	0,130 ^a	0,086 ^a	0,061 ^a	0,051 ^a	0,026 ^a	0,056 ^a
	DPM		2,658 ^a	2,492 ^a	2,626 ^a	1,636 ^b	0,948 ^b
	DX	0,176 ^a	0,042 ^a	0,043 ^a	0,030 ^a	0,004 ^a	0,146 ^a
	DXM		2,494 ^a	2,064 ^{ab}	1,456 ^{bc}	1,664 ^{bc}	1,020 ^c

Fonte: dados da pesquisa.

Nota: Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Nota 1: Letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa.

Legenda: (C) controle sem mola, (CM) controle com mola, (DP) diclofenaco de potássio sem mola, (DPM) diclofenaco de potássio com mola, (DX) dexametasona sem mola, (DXM) dexametasona com mola.

