

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

LILIAN MARY KARAKIDA

AVALIAÇÃO DA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS
SUBMETIDOS A ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS

Curitiba 2010

**AVALIAÇÃO DA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS
SUBMETIDOS A ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS**

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: Lilian Mary Karakida

Orientador: Prof. Dr. Odilon Guariza Filho



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

TERMO DE APROVAÇÃO

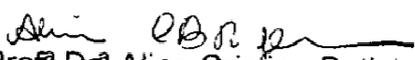
LILIAN MARY KARAKIDA

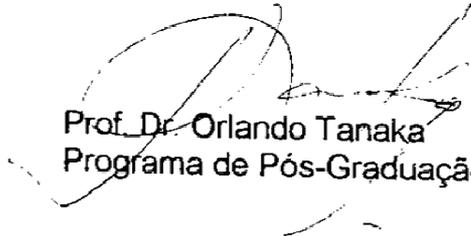
AVALIAÇÃO DA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS SUBMETIDOS A ESTERÓIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS

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.ª Dr.ª Aline Cristina Batista R. Johann
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


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

Curitiba, 03 de dezembro de 2010.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais FELICIO KOITI KARAKIDA e LIANA MARI CHONAN KARAKIDA, por serem exemplos de vida e pelo amor de carinho dispensado a nós.

Ao meu pai FELICIO por me mostrar e me guiar o caminho até a ortodontia, por ser um exemplo profissional a ser seguido.

A minha mãe LIANA por nunca me deixar desistir dos meus sonhos, me mostrando a realidade com compreensão e amor.

Ao meu irmão EDSON por suportar minhas crises existenciais com tanta paciência e nunca me abandonar. Pelo companheirismo, amor, amizade em todos os momentos importantes da minha vida.

A minha irmã SUSAN pelo amor e carinho sempre presente. Pela companhia constante na alegria e na tristeza.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Odilon Guariza Filho que soube me guiar nesse momento tão especial em minha vida. Exemplo de vida, pois além de ser um grande mestre, nos ensinando ortodontia, também nos ensina a viver. Obrigada pela confiança, dedicação, amor e apoio a mim dispensados. Desejo manter esta relação de amizade que construímos para sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado, mesmo quando fui omissa a Você.

A PUCPR pela oportunidade de continuar meus estudos numa instituição de qualidade, colaborando com o meu desenvolvimento profissional.

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

Aos mestres do programa de Pós-graduação em Odontologia, área de concentração Ortodontia da PUCPR: Elisa de Souza Camargo, Hiroshi Maruo, Orlando Tanaka.

Profa. Dra. Elisa Souza Camargo muito obrigada pelo conhecimento a nós repassado a cada dia de convivência.

Prof. Dr. Hiroshi Maruo obrigada pelos ensinamentos e tempo dispensado a mim, ajudando muito na minha formação como ortodontista.

Prof. Dr. Orlando Tanaka, por tudo, simplesmente tudo. Um dos meus maiores ídolos.

Aos membros da minha banca de qualificação Prof. Dr. Orlando Tanaka, Profa. Dra. Aline Cristina Batista Rodrigues Johann, Profa. Dra. Elisa de Souza Camargo. Pela essencial colaboração e correção deste trabalho.

Ao Prof. José Vinicius Bolognesi Maciel, por tirar as dúvidas mais simples e mais difíceis, por nos ajudar sempre que necessário, por nos mostrar caminhos diferentes a seguir.

A Profa. Dra. Aline Cristina Batista Johan pela ajuda e paciência dispensada, por sempre estar atualizada e não medir esforços em descobrir um mundo novo, ortodontia em ratos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Aparecido Ignácio, a quem devo a parte estatística e interpretação dos resultados. Pela paciência em explicar, ditar e refazer tudo sem pestanejar.

Ao funcionário Misael Gomes Barbosa, por toda ajuda durante a parte experimental do trabalho, não negando esforços.

Ao Biotério da PUCPR, em especial o zootecnista Rafael Zotz, por coadjuvar em nossas solicitações.

As funcionárias do Laboratório de Patologia Experimental, em especial a Ana Paula Camargo Martins, Marina Luise Viola De Azevedo e Profa. Dra. Lúcia de Noronha, pela dedicação, paciência e atenção no processamento laboratorial.

Aos meus colegas de turma Alinne Ulbrich Mores Rymovicz, Ana Leticia Rocha Avila, Denise Odete Manarelli, Dolores Fátima Navarro, Gabriela Pinto Molina da Silva, Ismael Signori, Lilian Mary Karakida, Maiara Medeiros Ronsani, Maria Cecilia Galacini Añez e Thiago Martins Meira, pelo companheirismo diário, paciência e amizade. Obrigada por compartilharem comigo esses 2 anos, com certeza estarão no meu coração para sempre, cada um com suas características especiais.

A minha amiga/irmã Maria Cecilia Galacini Añez, pela amizade, amor e paciência em todos esses anos. Obrigada.

A secretária Neide Reis Borges (Neidinha), por atender todos os meus pedidos e pela amizade construída.

A funcionária Maria Nilce (Nilcéia), por me suportar todas as quartas-feiras e fazer tudo por mim.

Aos meus amigos, por compreenderem a minha ausência quando esta se fez necessária por forças maiores. Por me ensinar a entender o real significado da palavra amizade. E por muitas vezes me ajudar a conquistar esse objetivo de vida.

Aos meus pacientes da clínica de Ortodontia, pela confiança e paciência durante todo o tempo. Vou sentir saudades.

Aos alunos do 7º e 8º períodos do curso de Odontologia por me mostrarem a docência, e pela amizade construída.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da realização desse objetivo!

SUMÁRIO

1. ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	9
PÁGINA TÍTULO.....	10
RESUMO.....	11
INTRODUÇÃO.....	12
MATERIAIS E MÉTODO.....	14
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
RESULTADOS.....	18
DISCUSSÃO.....	20
CONCLUSÃO.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
FIGURAS.....	29
TABELAS.....	31
2. ARTIGO EM INGLÊS.....	32
TITLE PAGE.....	33
ABSTRACT.....	34
INTRODUCTION.....	35
MATERIALS AND METHOD.....	37
STATISTICAL ANALYSIS.....	40
RESULTS.....	41
DISCUSSION.....	42
CONCLUSION.....	46
REFERENCES.....	47
FIGURES.....	49
TABLES.....	51
3. ANEXOS.....	52
ANEXO 1. Parecer Cômite Ética.....	53
ANEXO 2. Ilustração.....	54
ANEXO 3. Normas para publicação no periódico AJO-DO.....	55

1. ARTIGO PORTUGUÊS

PÁGINA TÍTULO

AVALIAÇÃO DA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS SUBMETIDOS A ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS

Lilian Mary Karakida

Mestranda em Odontologia- Área de concentração em Ortodontia
Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)
Curitiba, Paraná, Brasil

Odilon Guariza Filho

Mestre em Odontologia – Ortodontia – USP - SP
Doutor em Odontologia – Ortodontia – UNESP - Araraquara
Professor Titular – Curso de Odontologia – CCBS – PUCPR
Graduação e Pós-Graduação em Odontologia – Ortodontia

Endereço para correspondência:

Prof. Dr. Odilon Guariza Filho
Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Rua Imaculada Conceição, 1155
80.215-901 – Curitiba – PR – Brasil
Fone: 55 41 32711637 Fax: 55 41 32711405
Email: odilongfilho@gmail.com

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a interação entre movimentação dentária e utilização dos esteróides anabolizantes androgênicos (EAA) Deposteron® e Nebido®. Na pesquisa foram utilizados 100 ratos *wistar*, divididos em 3 grupos: controle, experimental Nebido (N) e experimental Deposteron (D). Foram utilizados dispositivos ortodônticos para a movimentação dentária. Na ativação foi utilizada 50cN de força recíproca entre o primeiro molar superior direito e os incisivos superiores. Após a morte dos animais, as peças foram processadas e coradas com HE. Foram quantificados osteoclastos, lacunas de Howship e vasos sanguíneos. A análise estatística baseou-se nos testes não paramétricos U de Mann-Whitney, Qui-quadrado, ANOVA a um e dois critérios e teste de comparações múltiplas de Games-Howell para variâncias heterogêneas. Os grupos N e D mostraram aceleração dos eventos histológicos quando comparados ao grupo C. O auge dos eventos no grupo C ocorreu no quinto dia após a instalação do dispositivo ortodôntico, enquanto para os grupos N e D aconteceu no terceiro dia. Houve diferença estatisticamente significativa em relação à osteoclastos ($p < 0,05$) quando comparados os grupos N3 e C3 e entre N3 e D3. Concluiu-se que doses supra-fisiológicas dos EAA Nebido® e Deposteron® aceleram os efeitos biológicos resultantes da movimentação dentária induzida em ratos.

INTRODUÇÃO

A busca incessante pela melhoria estética faz com que um número maior de pessoas recorra aos mais diversos métodos para alcançá-la. A Ortodontia está entre uma das alternativas para correção estética da face, pois corrige as desarmonias dentárias e esqueléticas. Outro aspecto importante na melhoria da estética corporal é a utilização de medicamentos que ajudam na hipertrofia muscular, principalmente na população jovem.

Dentre os medicamentos mais utilizados encontram-se os esteróides anabolizantes androgênicos (EAA), que são hormônios sintéticos derivados do hormônio sexual masculino, a testosterona. Os EAA possuem dois tipos de efeitos terapêuticos principais: androgênicos e anabólicos. Os efeitos androgênicos estão relacionados especificamente com a função reprodutora e características masculinas secundárias. Os efeitos anabólicos atuam sobre a estimulação do crescimento e maturação dos tecidos não-reprodutores. Sendo este o efeito esperado de quem faz uso dos EAA sem indicação terapêutica, pois estimulam o aumento muscular melhorando a estética corporal (1, 2).

O uso indevido dessas substâncias tem como principal alvo pré-adolescentes, adolescentes e adultos que buscam melhorar a aparência física e aumento do desempenho muscular. Nem mesmo a ilegalidade na forma de obtenção dos EAA, nem o potencial de desenvolvimento de efeitos adversos, parecem deter a utilização não indicada por médicos (3, 4).

A influência dos EAA têm sido descritas na literatura através de estudos que mostram a alteração no crescimento do complexo craniofacial,

aumentando o comprimento total da cabeça, alongamento dos incisivos superiores e inferiores em ratos *Wistar* (5, 6.). Gebhardt et al. encontraram um aumento no crescimento vertical e horizontal da mandíbula em ratos submetidos a doses de EAA em comparação com ratos submetidos a doses de placebo (7).

Os pacientes em tratamento ortodôntico podem fazer uso de esteróides anabolizantes que, associado ao potencial genético e a biomecânica ortodôntica, poderá possibilitar a ocorrência de efeitos indesejáveis e adversos àquelas objetivados e propostos no planejamento ortodôntico (8). Sendo assim, o profissional deve investigar os hábitos dos pacientes orientando e intervindo se necessário. Portanto devido a inexistência de pesquisas entre a interação dos EAA e a movimentação ortodôntica realizamos a pesquisa.

Como objetivo principal avaliamos e comparamos a interação entre a movimentação dentária induzida e a utilização de esteróides anabolizantes androgênicos (Deposteron® e Nebido®), em ratos.

MATERIAIS E MÉTODO

O presente estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob o parecer CEUA nº 492.

Para a realização do trabalho foram utilizados 100 ratos machos, da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus albinus)*, com 09 semanas de vida e aproximadamente 300 – 350g. Os medicamentos utilizados na pesquisa foram: Deposteron® 200mg (Cipionato de Testosterona - Sigma Pharma – Hortolândia-SP – Brasil) e Nebido® 250mg (Undecanoato de Testosterona – Bayer – São Paulo-SP – Brasil). Foi esquematizado um calendário de aplicações dos anabolizantes, sendo 2 aplicações semanais de 1,25mg por aplicação, resultando em 2,5mg/semana. Concordando ser uma dose supra-fisiológica para ratos (9, 10, 11, 12). A aplicação dos esteróides anabolizantes androgênicos (EAA) foi realizada via intramuscular, no músculo reto femoral, alternando-se os lados direito e esquerdo em cada aplicação. Após 20 dias de aplicação do EAA foram instalados os dispositivos ortodônticos para a movimentação dentária induzida.

Para a instalação do dispositivo ortodôntico os animais foram sedados com uma solução anestésica de Tiletamina/Zolazepam (Zoletil®50, Virbac – Jurubatuba – SP - Brasil), na dosagem de 50mg/kg.

O dispositivo ortodôntico foi construído a partir de uma mola fechada de *Nickel Titanium* de 9mm de comprimento (3M Unitek® - St. Paul – MN – USA) e fio de amarrilho de aço inox com 0,0020 polegadas (Morelli® - Sorocaba – SP – Brasil), para fixação da mola no primeiro molar e no

incisivo superior. A força do dispositivo ortodôntico foi mensurada e programada para liberar uma força recíproca de 50cN. Não foram realizadas ativações do dispositivo ortodôntico durante o experimento, apenas a conferência diária da estabilidade da mola e a possível interferência dos incisivos inferiores.

Os animais foram divididos em 3 grupos: grupo controle (C), Nebido experimental (N) e Deposteron experimental (D). O grupo controle foi subdividido em seis subgrupos: 1, 2, 3, 5, 7 e 14 dias da instalação do dispositivo ortodôntico, e em cada grupo experimental (N e D) foram subdivididos em subgrupos 7: 0, 1, 2, 3, 5 e 14 dias da instalação do dispositivo ortodôntico.

Os animais foram mortos utilizando-se uma dose excessiva de solução anestésica (pentobarbital sódico), via intraperitoneal. Após a dissecação e separação da maxila do lado direito, as peças foram acondicionadas individualmente em solução de formalina tamponada a 10% por 72 horas e desmineralizadas em solução de EDTA 4,13% até a descalcificação adequada para a realização dos cortes histológicos.

Depois de confirmada a desmineralização, as peças foram emblocadas em parafina e para obtenção das lâminas foram realizados cortes transversais na região do colo do primeiro molar superior. Em todos os cortes foi observada a presença da raiz intermediária, osso alveolar, ligamento periodontal. Os cortes obtidos foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) de Harris e Lison.

Para a análise das lâminas foi utilizada a microscopia de luz, com aumento original de 400X. A leitura das lâminas foi realizada por um único operador devidamente calibrado em um mesmo microscópio.

Para a leitura das lâminas considerou-se lado de compressão a face mesial do primeiro molar superior direito, sendo este o lado para qual o dente foi deslocado pela força empregada. E o lado de tração a face distal do primeiro molar superior direito, lado de tensão do ligamento periodontal.

Utilizou-se a coloração HE para reconhecer e quantificar o número de vasos sanguíneos, células osteoclasticas, lacunas de Howship, organização das fibras colágenas e morfologia dos fibroblastos presentes nos lados de compressão e tração do ligamento periodontal adjacente à raiz intermediária do primeiro molar superior direito. Foi avaliada, também, a presença ou não de reabsorção solapante nas proximidades da raiz intermediária e áreas de hialinização em todas as raízes do primeiro molar superior direito.

Após a análise dos dados obtidos através da microscopia óptica para a confirmação da contagem de osteoclastos, os cortes foram corados com *Tartrate-resistant Acid Phosphatase* (TRAP – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e contrastadas com hematoxilina, em conformidade com as instruções do fabricante. As células foram consideradas osteoclastos se fossem multinucleadas, TRAP positiva, e localizadas sobre ou perto da superfície.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparar os grupos experimentais no tempo 0 (zero), para as 3 variáveis contínuas, utilizou-se o teste não paramétrico U de Mann-Whitney, uma vez que o tamanho da amostra foi $n=5$. Da mesma forma, para as variáveis categóricas foi utilizado o teste Qui-quadrado para identificar se existia dependência entre cada uma das variáveis.

Na comparação entre todos os tempos para cada grupo experimental (D e N) utilizou-se o teste Qui-quadrado para as variáveis categóricas, enquanto para as variáveis contínuas utilizou ANOVA a um critério de classificação. Essa escolha baseou-se no princípio de que apesar de cada tempo apresentar $n=5$, foram observados valores de média e mediana próximos, indicando distribuição simétrica entre os dados. Quando o teste ANOVA indicou diferença, tanto dentro do grupo N quanto para o grupo D, utilizou-se o teste não paramétrico de comparações múltiplas de Games-Howell para variâncias heterogêneas, visando identificar quais tempos diferiram entre si.

Visando comparar se havia diferença para as variáveis categóricas entre os 3 grupos independente de tempo, entre tempo independente de grupo e considerando simultaneamente grupo X tempo, utilizou-se o teste Qui-quadrado. Para as variáveis contínuas utilizou-se ANOVA a 2 critérios de classificação, modelo fatorial completo, onde foi possível testar se havia diferença entre grupo, tempo, e a interação grupo X tempo.

RESULTADOS

Pode-se avaliar uma média numérica maior de todas as variáveis nos grupos experimentais (Nebido e Deposteron) que no grupo controle (C). Havendo diferenças estatisticamente significantes quando comparado grupo x tempo *versus* grupo x tempo, nas variáveis osteoclastos e lacunas de Howship ($P < 0,05$).

Os grupos N e D demonstraram um adiantamento dos eventos histológicos quando comparados ao grupo C. O auge dos eventos no grupo C ocorreu em C5, ou seja, quinto dia após a instalação do dispositivo ortodôntico, sendo que os grupos N e D, experimentais, esses eventos aconteceram no terceiro dia.

As lacunas de Howship são indicativos de que os osteoclastos estão ativos, resultando em uma irregularidade do osso alveolar na área de compressão. Para confirmar se havia reabsorção ativa em direção ao osso alveolar foi realizada a correlação de Pearson. O valor estatisticamente significativo de $P < 0,01$ mostra uma forte relação entre as variáveis osteoclastos e lacunas de Howship, confirmando a reabsorção óssea ativa. Notou-se que o aumento de osteoclastos é seguido por um aumento de lacunas de Howship.

Quando observado o comportamento do grupo N na relação grupo x tempo nas diferentes variáveis estudadas, notou-se que no dia 03 houve diferença estatisticamente significativa em relação à quantidade de osteoclastos e lacunas de Howship ($p < 0,05$), quando comparados os grupos N3 e C3 e para N3 e D3, vez que o grupo N obteve as maiores médias

numéricas. As médias de osteoclastos para N3 foi de 14,0; em C3 de 7,4; e em D3 de 18,0.

DISCUSSÃO

A utilização dos esteróides anabolizantes androgênicos (EAA) está cada vez maior, pois pessoas que buscam uma melhor aparência ou uma melhor desenvoltura muscular utilizam estes medicamentos. Estima-se que 2,2% da população adolescente, do sul do Brasil, já fizeram uso de algum tipo de EAA ilicitamente (13).

A dose utilizada pelos usuários dos EAA, para que se obtenha um efeito anabólico, são comumente supra-fisiológicas. Estudos comprovam que doses iguais ou acima de 500mg/semana são consideradas supra-fisiológicas, para humanos adultos. Utilizou-se no presente estudo uma dosagem de 2,5mg/semana, baseando-se na proporção homem/rato, sendo então esta uma dose supra-fisiológica para ratos (9, 10, 11, 12, 14, 15).

Para a avaliação da interação dos EAA e a movimentação dentária induzida foram escolhidos dentes da maxila para a aplicação da força. De acordo com Fracalossi, o melhor dente de escolha, para a movimentação dentária induzida, é o primeiro molar superior por se tratar de um dente que não apresenta rizogênese contínua e suas raízes não são próximas das raízes dos incisivos superiores (16). Os incisivos superiores são considerados dentes de ancoragem, pois possuem uma raiz curva, longa, volumosa e constante rizogênese. Estes fatores foram levados em conta para a utilização do primeiro molar superior direito e dos incisivos superiores na pesquisa. Para análise histológica foi utilizada a raiz intermediária do primeiro molar superior direito dos ratos.

O emprego da força de 50cN utilizada para ativação do dispositivo ortodôntico é equivalente a, aproximadamente, uma força de 2500cN em

humanos (16). Esta, com certeza, é uma força alta/pesada e provoca reabsorções exageradas no osso e nos dentes humanos. Desta maneira, a força aplicada no experimento não seria ideal para a clínica ortodôntica. Como o propósito do estudo foi avaliar os aspectos microscópicos da movimentação ortodôntica induzida, com uma força contínua, a força de 50cN é pertinente. Pois, o estudo não evitou fenômenos biológicos exagerados nos tecidos analisados. Ao contrário da clínica, o trabalho necessita da presença desses fenômenos biológicos para estudar algumas condicionantes que alteram as características microscópicas dos tecidos.

Segundo Fortunato, os EAA tem direta influência com a reabsorção óssea que é caracterizada pelo aumento de osteoclastos (17). Santos-Pinto et al. e Silva, afirmam que a utilização de esteróides com atividade androgênica acelera a cronologia do reparo alveolar (18, 19). Falanga, encontrou em suas pesquisas que os EAA também aumentam a síntese de colágeno, mesmo não havendo aumento considerável de fibras colágenas (20). No presente estudo verificou-se que houve um aumento e adiantamento da reabsorção óssea e reorganização das fibras colágenas do ligamento periodontal nos casos em que foram administrados os EAA. Estes dados nos sugerem que a remodelação óssea pode ter ocorrido mais precocemente.

Os resultados obtidos no grupo controle foram semelhantes aos de Heller e Nanda e Macapanpan et al., em que descreveram uma resposta biológica e tecidual normal sobre o ligamento periodontal e osso alveolar quando se gera uma força ortodonticamente induzida (21, 22). Não existem, até o momento, estudos que mostrem a interação entre os EAA e a

movimentação dentária induzida. No entanto, o presente estudo relata diferenças estatisticamente significantes na comparação entre os grupos experimentais e o grupo controle.

Quando se avaliou a quantidade de osteoclastos e lacunas de Howship entre os grupos num mesmo tempo, verificou-se que os grupos experimentais (N e D) tiveram eventos mais significativos ao dia 3, enquanto o grupo controle teve sua maior quantificação no dia 5.

Constatou-se também, que as médias numéricas de osteoclastos obtidas pelos grupos experimentais foram maiores do que no grupo controle, principalmente quando se comparou o dia 3, demonstrando uma aceleração da reabsorção em N e D. Houve diferenças estatisticamente significantes quando comparados C3 e N3 e entre D3 e N3 ($p < 0,05$), na comparação C3 e D3 não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). A hipótese de que a reabsorção óssea foi mais evidente em N pode ser decorrente ao fato dos anabolizantes agirem como os hormônios de crescimento, atuando com efeito bifásico acelerando a reabsorção e posteriormente promovendo a deposição óssea, corroborando também com os resultados de Simpson et al. e Carroll et al. (23, 24).

Decorrente aos resultados obtidos verificou-se médias numéricas maiores de vasos sanguíneos nos grupos experimentais quando comparados ao grupo controle, estudos relacionados à angiogênese são escassos na literatura, entretanto segundo Carvalho há um aumento na quantidade de vasos neoformados quando se utiliza EAA (25). No presente estudo também se observou este aumento de vasos sanguíneos.

Posteriores estudos poderão ser realizados para melhor compreensão deste aumento.

A organização das fibras colágenas no lado de compressão do ligamento periodontal se deu a partir do dia 5 nos grupos experimentais, enquanto no grupo controle esta reorganização só foi notada a partir do dia 14 da instalação do dispositivo ortodôntico. Áreas de hialinização foram encontradas em todos os dias do experimento, independente do tempo, comprovando que o uso da força foi exagerada, exacerbando os efeitos biológicos da força sobre o ligamento periodontal. Nos grupos experimentais esta hipóxia do ligamento periodontal se restabeleceu mais rapidamente que no grupo controle, sendo que no grupo controle áreas de hialinização foram encontradas até o dia 14 e nos grupos experimentais houve uma redução significativa dessas áreas a partir do sétimo dia. Isto nos leva a sugerir que há uma diminuição no tempo de remodelação e reparo tecidual nos grupos N e D (experimentais) do que no grupo C. Carvalho, 1985 e Falanga, 1998 mostram que há um aumento na quantidade de fibroblastos, síntese de colágenos e substância fundamental, em pessoas que fazem uso dos EAA, afirmando os resultados sobre a reorganização adiantada das fibras colágenas no ligamento periodontal (20, 25).

Não podemos afirmar que a utilização dos EAA acelerou a movimentação dentária. Este estudo serviu apenas para avaliar as possíveis interações dos EAA no ligamento periodontal. Não foi avaliado se a quantidade de deslocamento (inclinação mesial) do primeiro molar superior direito dos ratos foi a mesma nos grupos experimentais e no controle.

Estudos com relação à interação dos EAA e a movimentação ortodôntica ainda têm que ser mais aprofundados. Os pacientes ortodônticos estão cada vez mais criteriosos com relação à estética e muitos podem fazer uso dessas substâncias durante o tratamento ortodôntico. Devido a essa mudança comportamental devem-se considerar as interações medicamentosas e o tratamento ortodôntico.

CONCLUSÃO

Conclui-se que doses supra-fisiológicas dos esteróides anabolizantes androgênicos Nebido® e Deposteron® aceleram os efeitos biológicos resultantes da movimentação dentária induzida em ratos. Houve alteração na quantidade de osteoclastos, lacunas de Howship e vasos sanguíneos e acelerou a reorganização do ligamento periodontal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ghaphery NA. Performance-enhancing drugs. *Orthop Clin North Am.* 1995 Jul;26(3):433-42.
2. Cunha TSC, N.S.; Moura, M.J.C.S.; Marcondes, F.K. Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2004;40(2):165-79.
3. Faigenbaum AD, Zaichkowsky LD, Gardner DE, Micheli LJ. Anabolic steroid use by male and female middle school students. *Pediatrics.* 1998 May;101(5):E6.
4. Lobo APT. O uso indevido de anabolizantes na cidade de São Paulo: um estudo qualitativo. São Paulo: EPM-UNIFESP; 2002.
5. Barrett RL, Harris EF. Anabolic steroids and craniofacial growth in the rat. *Angle Orthod.* 1993 Winter;63(4):289-98.
6. Noda K, Chang HP, Takahashi I, Kinoshita Z, Kawamoto T. Effects of the anabolic steroid nandrolone phenylpropionate on craniofacial growth in rats. *J Morphol.* 1994 Apr;220(1):25-33.
7. Gebhardt A, Pancherz H. The effect of anabolic steroids on mandibular growth. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003 Apr;123(4):435-40.
8. Tanaka OM. Estudos dos efeitos da aplicação de hormônios de crescimento e ratos "Wistar". Rio de Janeiro: FO-UFRJ; 1998.
9. Catlin DH, Murray TH. Performance-enhancing drugs, fair competition, and Olympic sport. *JAMA.* 1996 Jul 17;276(3):231-7.
10. Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, Singh AB, Bhasin D, Berman N, et al. Testosterone dose-response relationships in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 Dec;281(6):E1172-81.
11. Sinha-Hikim I, Artaza J, Woodhouse L, Gonzalez-Cadavid N, Singh AB, Lee MI, et al. Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Jul;283(1):E154-64.
12. Parkinson AB, Evans NA. Anabolic androgenic steroids: a survey of 500 users. *Med Sci Sports Exerc.* 2006 Apr;38(4):644-51.
13. Dal Pizzol TSB, M.M.N.; Carvalho, R.M.A.; Pasqualotti, A.; Maciel, E.N.; Migott, A.M.B. Uso não-médico de medicamentos psicoativos entre escolares do ensino fundamental e médio no Sul do Brasil. *Cad Saúde Pública.* 2006;22(1):109-15.

14. Hardman JG GA, Linbird LE. The pharmacological basis of therapeutics. 9th ed. Gilman's Ga, editor. New York: McGraw-Hill 1996.
15. Wu FC. Endocrine aspects of anabolic steroids. Clin Chem. 1997 Jul;43(7):1289-92.
16. Fracalossi ACC SJM, Consolaro MFM-O, Consolaro, A. Movimentação dentária experimental em murinos: período de observação e plano dos cortes microscópicos. R Dental Press Ortodont Ortop Facial. 2009;14(1):143-57.
17. Fortunato RS, Rosenthal D, Carvalho DP. [Abuse of anabolic steroids and its impact on thyroid function]. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2007 Dec;51(9):1417-24.
18. dos Santos-Pinto R, Okamoto T, de Castro AL. Pharmacological effect of nandrolone phenylpropionate on the healing of dental extraction wounds: a histological investigation in rats. J Nihon Univ Sch Dent. 1970 Jun;12(2):57-61.
19. Silva EMM. Estudo comparativo dos efeitos de esteróides androgênica, progestacional e anabolizante sobre a cronologia do processo de reparo em feridas de extração em ratos. Araçatuba: UNESP; 1984.
20. Falanga V, Greenberg AS, Zhou L, Ochoa SM, Roberts AB, Falabella A, et al. Stimulation of collagen synthesis by the anabolic steroid stanozolol. J Invest Dermatol. 1998 Dec;111(6):1193-7.
21. Heller IJ, Nanda R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. An experimental study. Am J Orthod. 1979 Mar;75(3):239-58.
22. Macapanpan LC, Weinmann JP. The influence of injury to the periodontal membrane on the spread of gingival inflammation. J Dent Res. 1954 Apr;33(2):263-72.
23. Simpson H, Savine R, Sonksen P, Bengtsson BA, Carlsson L, Christiansen JS, et al. Growth hormone replacement therapy for adults: into the new millennium. Growth Horm IGF Res. 2002 Feb;12(1):1-33.
24. Carroll PV, Christ ER, Bengtsson BA, Carlsson L, Christiansen JS, Clemmons D, et al. Growth hormone deficiency in adulthood and the effects of growth hormone replacement: a review. Growth Hormone Research Society Scientific Committee. J Clin Endocrinol Metab. 1998 Feb;83(2):382-95.

25. Carvalho ACPO, T. Interferências sistêmicas sobre o processo de reparo em feridas de extração dental. Rev Odont UNESP. 1985;14(1/2):27-33.

FIGURAS

LEGENDAS:

AO/AB – osso alveolar

LP/PL – ligamento periodontal

C – cimento

D – dentina

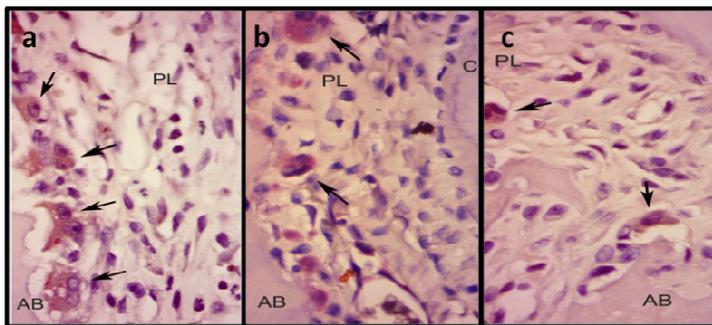


Figura 1. No dia 3 um maior número de osteoclastos (TRAP – células positivas, flechas pretas) foram observadas no grupo D (a) e no grupo N (b) quando comparadas ao grupo C (c).

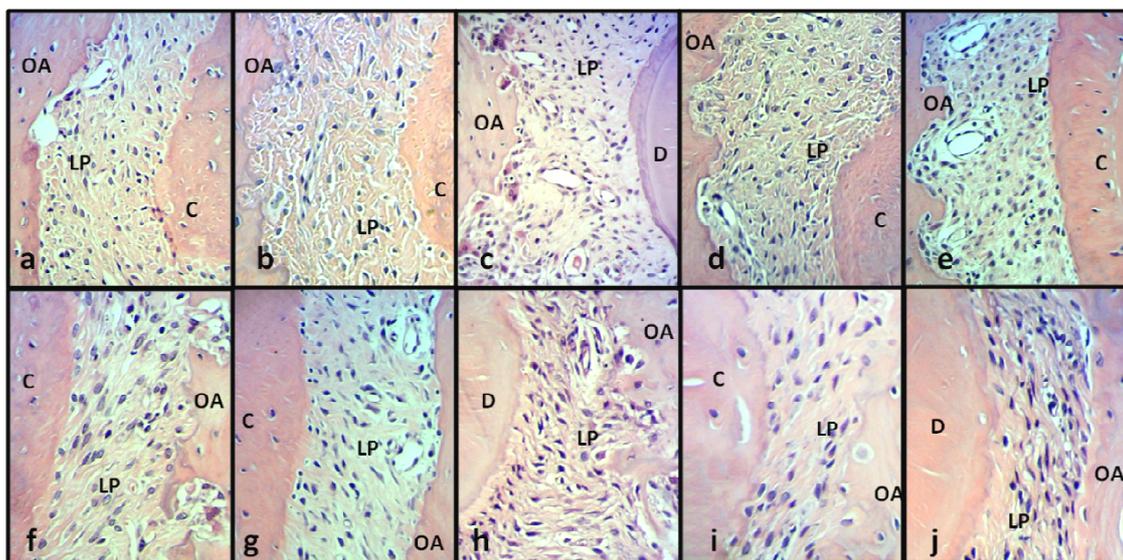


Figura 2. Grupo Controle. Em a, b, c, d, e lado de compressão do ligamento periodontal, nos dias 1, 3, 5, 7 e 14 respectivamente. Em f, g, h, i, j lado de tração do ligamento periodontal, nos dias 1, 3, 5, 7 e 14 respectivamente.

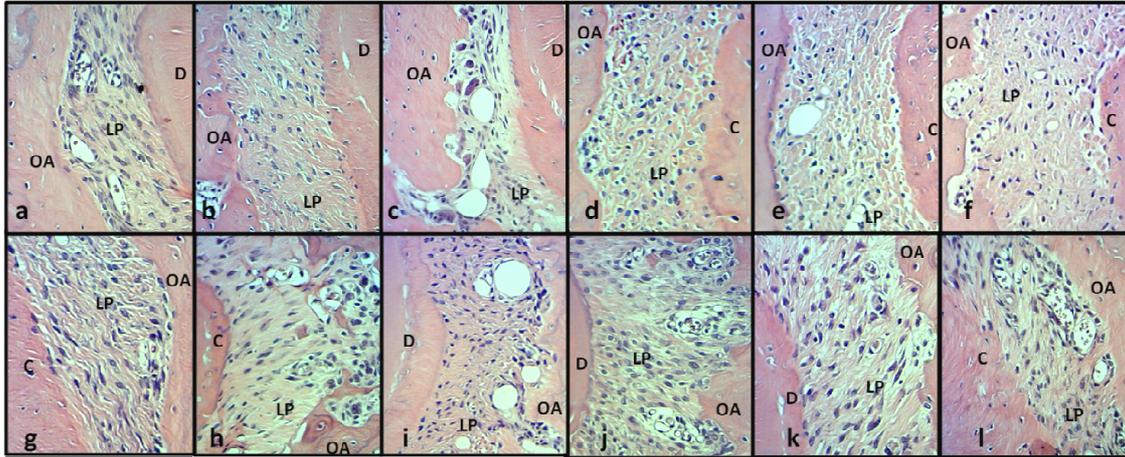


Figura 3. Grupo Experimental Deposteron. Em a, b, c, d, e lado de compressão do ligamento periodontal nos dias 0, 1, 3, 5, 7 e 14 respectivamente. Em g, h, i, j, k lado de tração do ligamento periodontal nos dias 0, 1, 3, 5, 7 e 14 respectivamente.

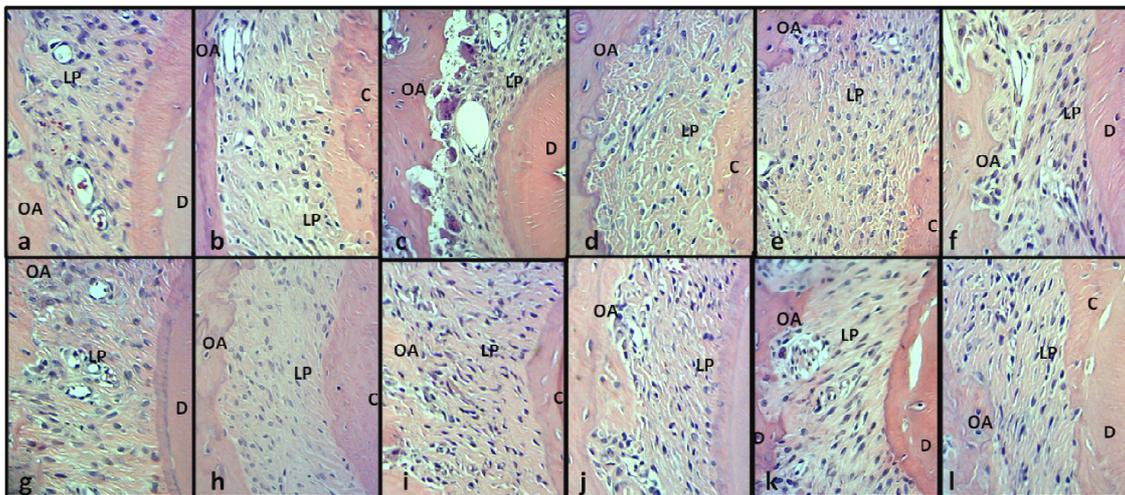


Figura 4. Grupo Experimental Nebido. Em a, b, c, d, e lado de compressão do ligamento periodontal nos dias 0, 1, 3, 5, 7 e 14 respectivamente. Em g, h, i, j, k lado de tração do ligamento periodontal nos dias 0, 1, 3, 5, 7 e 14 respectivamente.

TABELAS

Tabela I : Descrição da divisão dos animais e cronograma de morte dos animais.

100 ratos	Grupo Controle	30 ratos	Sem medicação	Morte após 1, 2, 3, 5, 7 e 14 dias da instalação do dispositivo ortodôntico
	Grupo Experimental Nebido	35 ratos	20 dias de administração do EAA Nebido®, antes da instalação do dispositivo ortodôntico	Morte após 0, 1, 2, 3, 5, 7 e 14 dias da instalação do dispositivo ortodôntico
	Grupo Experimental Deposteron	35 ratos	20 dias de administração do EAA Deposteron®, antes da instalação do dispositivo ortodôntico	Morte após 0, 1, 2, 3, 5, 7 e 14 dias da instalação do dispositivo ortodôntico

Tabela II: Análise descritiva da comparação de 3 variáveis, segundo grupo X tempo.

TABELA 1. ANÁLISE DESCRITIVA DA COMPARAÇÃO DE 3 VARIÁVEIS, SEGUNDO GRUPO X TEMPO							
VARIÁVEL	GT	GT	MÉDIA	D.P.	MÉDIA	D.P.	p
Osteoclasto	C3	N3	7,4	4,3	14	4,3	0,00097*
	C3	D3	7,4	4,3	9	3,7	0,33659
	N3	D3	14	4,3	9	3,7	0,01579*
Lacunas de Howship	C3	N3	17	7,2	22	7,4	0,0029*
	C3	D3	17	7,2	14	7,1	0,2821
	N3	D3	22	7,4	14	7,1	0,0497*
Vasos sanguíneos	C3	N3	14,6	4,9	20,4	4,8	0,067298
	C3	D3	4,6	4,9	18	3,2	0,99586
	N3	D3	20,4	4,8	18	3,2	0,99995
FONTE : Dados da pesquisa							
LEGENDA: GT - grupo x tempo; D.P. - Desvio Padrão							
NOTA: * Valor estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.							

2. ARTIGO EM INGLÊS

TITLE PAGE**EVALUATION OF INDUCED TOOTH MOVEMENT IN RATS SUBMITTED TO ANABOLIC ANDROGENIC STEROIDS.****Lilian Mary Karakida, DDS, MSc**

Dentistry Graduate Program

Pontifical Catholic University of Parana (PUCPR), Curitiba, Brazil

Email: lilian.karakida@gmail.com

Odilon Guariza Filho, DDS, MSc, PhD

Senior Professor, Graduate Dentistry Program, Orthodontics

Dentistry Graduate Program

Pontifical Catholic University of Parana (PUCPR), Curitiba, Brazil

CORRESPONDING AUTHOR

Prof. Dr. Odilon Guariza Filho

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Rua Imaculada Conceição, 1155

80.215-901 – Curitiba – PR – Brasil

Telephone: +55 41 32711637 Fax: +55 41 32711405

Email: odilongfilho@gmail.com

ABSTRACT

This study evaluated the interaction between tooth movement and the use of the anabolic androgenic steroids (AAS) Deposteron® and Nebido®. In this study were used 100 *wistar* rats, divided into 3 groups: control (C), Nebido experimental (N) and Deposteron experimental (D). Orthodontic devices were used to induce tooth movement. In the activation was used 50 cN of reciprocal force, between the upper right first molar and the upper incisors. After the death of the animals, the pieces were processed and stained with HE. Osteoclasts, Howship's lacunae and blood vessels were quantified. After the statistical analysis we found that groups N and D showed acceleration of the histological events, compared to group C. The peak of the events in group C occurred on the fifth day after the installation of the orthodontic device, while in groups N and D it occurred on the third day. There was statistically significant difference in relation to the osteoclasts ($p < 0.05$) when groups N3 and C3 were compared, and between groups N3 and D3. It was concluded that supra-physiological doses of the AAS Nebido® and Deposteron® accelerate the biological effects resulting from induced tooth movement in rats.

INTRODUCTION

The continuous search for esthetic improvement drives a greater number of people to resort to the widest range of methods to reach it. The orthodontic treatment is one of the alternatives for esthetic correction of the face, because it corrects dental and skeletal discrepancies. Another important aspect in improving body esthetics is the use of medications that help with muscular enlargement, mostly in young people.

The most used medications are the anabolic androgenic steroids (AAS), which are synthetic hormones derived from the male sex hormone, the testosterone. AAS have two main types of therapeutic effects: androgenic and anabolic. Androgenic effects are specifically related to the reproductive function, and to secondary male characteristics. Anabolic effects stimulate the growth and maturation of non-reproductive tissues. This is the desired effect among those who use AAS without therapeutic indication because they stimulate muscle growth, improving body esthetics (1, 2).

The main targets for the misuse of these substances are pre-adolescents, adolescents and adults seeking to improve physical appearance and increase muscular performance. Not even the illegality in the way of obtaining the AAS, or the potential of developing adverse effects; seem to stop the inappropriate use without a medical prescription (3, 4).

The influence of AAS has been described in studies which show the change in growth of the craniofacial complex, increasing the total length of the head and elongating the upper and lower incisors in *Wistar* rats (5, 6). Gebhart et al. found an increase in the vertical and horizontal growth of the

mandible in rats subjected to doses of AAS, compared to rats subjected to doses of a placebo (7).

Patients undergoing orthodontic treatment may use anabolic steroids that associated with the genetic potential and biomechanical orthodontics, may lead to effects that are adverse and unwanted regarding the objectives and proposals of the orthodontic treatment (8). Thus, the professional must ascertain the habits of the patients, guiding and intervening if necessary. This study was undertaken due to the lack of research on the interaction between AAS and orthodontic movement.

Our main objective was to evaluate and compare the interaction between induced tooth movement and the use of anabolic androgenic steroids (Deposteron® e Nebido®) in rats.

MATERIALS AND METHOD

The present study was evaluated and approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) of the Catholic Pontifical University of Paraná (PUCPR), CEUA nº 492.

This study used 100 male *Wistar* rats (*Rattus norvegicus albinus*), 9 weeks old and approximately 300-350g. The medications used were Deposteron® 200mg (Testosterone Cypionate - Sigma Pharma – Hortolândia-SP – Brazil) and Nebido® 250mg (Testosterone Undecanoate – Bayer – São Paulo-SP – Brazil). A schedule of applications of the anabolic steroids was designed, with 2 weekly applications of 1.25mg per application, resulting in 2.5mg/week. This conforms to a supra-physiological dose, in rats (9, 10, 11, 12). The application of anabolic androgenic steroids (AAS) was performed by intramuscular injection into the rectus femoral muscle, alternating the right and left sides with each application. After 20 days of AAS application, the orthodontic devices to induce tooth movement were installed.

The animals were divided into 3 groups: control (C), Nebido experimental (N) and Deposteron experimental (D). The control group was subdivided into 6 subgroups: 1, 2, 3, 5, 7 and 14 days of; and in each experimental group (N and D) were subdivided into 7 subgroups: 0, 1, 2, 3, 5, and 14 days orthodontic device installation.

The animals were sedated for the installation of the orthodontic device, using an anesthetic solution of 50 mg/kg dose of Tiletamine/Zolazepam (Zoletil®50, Virbac – Jurubatuba – SP - Brazil).

The orthodontic device was constructed of a closed Nickel Titanium coil spring, 9mm (3M Unitek® - St. Paul – MN – USA) and wire for ligature –

round Ø 0,20mm (Morelli[®] - Sorocaba – SP – Brazil), to attach the spring to the first molar and the upper incisor. The force of the orthodontic device was measured and programmed to release a reciprocal force of 50cN. No activation of the orthodontic device was performed during the experiment, only the daily stability check of the spring and the possible interference of the lower incisors.

The animals were killed using an excessive dose of anesthetic solution (sodium pentobarbital), intraperitoneal injection. Following dissection and separation of the maxilla of the right side, the pieces were wrapped individually in a 10% buffered formalin solution for 72 hours and demineralized in a 4.13% EDTA solution until adequately decalcified to perform the histological sections.

After demineralization confirmation, the pieces were embedded in paraffin and, to obtain the slides, transversal cuts were made in the tooth neck region of the first upper molar. In all sections was observed the presence of intermediate root, alveolar bone, and periodontal ligament. The obtained sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) of Harris and Lison's.

Was used to analyze the slides a light microscopy, with 400X magnification. The reading of the slides was performed by a single, calibrated operator, using the same microscope.

To read the slides was considered side compression to the mesial of the first upper right molar, which is the side where the tooth was moved by the applied force. Also, the traction side was the distal face of the first upper right molar is the tension side of the periodontal ligament.

HE staining was used to identify and quantify the number of blood vessels, osteoclastic cells, Howship's lacunae, the organization of collagen fibers and the morphology of the fibroblasts present in the compression and traction side of the periodontal ligament, adjacent to the intermediate root of the first upper right molar. Also, the presence or absence of overlapping resorption was analyzed near the intermediate root and areas of hyalinization of all the roots of the first upper right molar.

Following the analysis of the data obtained by light microscopy to confirm the count of osteoclasts, the sections were stained with *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and contrasted with hematoxylin according to manufacturer's instructions. The cells were considered to be osteoclasts if they were multinucleated, TRAP positive, and located on or near the surfaces.

STATISTICAL ANALYSIS

To compare the experimental groups at time 0 (zero) for the 3 continuous variables was used the non-parametric Mann-Whitney U test, since the sample size was $n=5$. Similarly, the Chi-square test was used for the categorical variables to identify whether dependence existed between each of the variables.

To compare all the times for each experimental group (D and N), the Chi-square test was used for the categorical variables; the one-way ANOVA was used for the continuous variables. This choice was based on the principle that, despite each time representing $n=5$, similar mean and median values were observed indicating symmetrical distribution of the data. When the ANOVA test indicated difference, within both the N group and the D group, the non-parametric Games-Howell test of multiple comparisons for heterogeneous variances was used to identify which times differed among them.

In order to compare if there was difference in the categorical variables among the 3 groups, regardless of time, among time regardless of group and simultaneously considering group X time, the Chi-square test was used. The two-way ANOVA, full factorial model, was used for continuous variables when it was possible to test if there were differences among group, time and the interaction of group X time.

RESULTS

A greater numeric mean of all the variables in the experimental groups (Nebido and Deposteron), in comparison to the control group (C), was observed. There were statistically significant differences when comparing group X time *versus* group X time in the osteoclast and Howship's lacunae variables ($P < 0.05$).

Groups N and D showed an advance of histological events when compared to group C. The peak of the events of group C occurred at C5, that is, the fifth day after the installation of the orthodontic device. In experimental groups N and D, these events occurred on the third day (N3 and D3).

Howship's lacunae are indicative that the osteoclasts are active, resulting in irregularity in the alveolar bone in the compression area. To confirm if there was active resorption into the alveolar bone, the Pearson correlation was performed. The statistically significant value of $P < 0.01$ shows a strong relationship among the variables: osteoclast and Howship's lacunae, confirming active bone resorption. It was noted that the increase in osteoclasts is followed by an increase in Howship's lacunae.

When observing the behavior of group N, in the group X time relationship in the different variables studied, it was noted that on day 3 there was a statistically significant difference in relation to the amount of osteoclasts and Howship's lacunae ($p < 0.05$) when compared to the N3 X C3 groups and the N3 X D3, as the N group had the largest numeric means. The numeric means of the osteoclasts for N3 was 14.0; for C3 was 7.4; and for D3 was 18.0.

DISCUSSION

The use of anabolic androgenic steroids (AAS) is increasing, by people seeking improved appearance or better muscular development. It is estimated that 2.2% of the adolescent population in the south of Brazil have already used some type of AAS illicitly (13).

The doses taken by users of AAS, to obtain an anabolic effect, are commonly supra-physiological. Studies show that doses equal to or greater than 500 mg/week are considered supra-physiological for human adults. A dose of 2.5 mg/week was used in the present study, based on the proportion human/rat. This is a supra-physiological dose for rats (9, 10, 11, 12, 14, 15).

To evaluate the interaction of AAS and induced tooth movement, maxillary teeth were chosen for the application of force. According to Fracalossi et. al., the best tooth to choose for induced tooth movement is the upper right first molar because it has no continuous root formation and its roots are not near the roots of the upper incisors (16). The upper incisors are considered anchor teeth because they have a long, curved, massive root, and continuous root formation. These factors were taken into account for the use of the first upper right molar and for the upper incisors, in this study. The intermediate roots of the first upper right molars of the rats were used for histological analysis.

The application of 50cN of force to activate the orthodontic device is equivalent to approximately 2500cN of force in humans (16). This is certainly a high/heavy force, and causes exaggerated resorptions in human bone and teeth. Therefore, the force applied in the experiment would not be ideal in clinical orthodontics. As the purpose of the study was to evaluate the

microscopic aspects of orthodontic movement induced using continuous force, the force of 50cN is pertinent. So, the study did not avoid exaggerated biological phenomena in the tissues analyzed. Contrary to the clinic, this work requires the presence of these biological phenomena in order to study some of the conditions which alter the microscopic characteristics of the tissues.

According to Fortunato, AAS have direct influence on bone resorption which is characterized by the increase in osteoclasts (17). Santos-Pinto et al. and Silva assert that the use of steroids with androgenic activity accelerates the chronology of alveolar repair (18, 19). Falanga, in his research, found that AAS also increase collagen synthesis, even with no considerable increase in collagen fibers (20). The present study verified that there was an increase and advance in bone resorption and reorganization of the collagen fibers of the periodontal ligament in cases in which AAS were administered. These data suggest that bone remodeling may have occurred precociously.

The results obtained in the control group were similar to those of Heller and Nanda, and Macapanpan et al., in that they described a normal biological and tissue response of the periodontal ligament and alveolar bone when an orthodontically induced force is generated (21, 22). Until now, there are no studies that show the interaction between AAS and induced tooth movement. However, the present study reports statistically significant differences in the comparison between the experimental and control groups.

When the amount of osteoclasts and Howship's lacunae between groups at the same period of time was assessed, it was verified that the

experimental groups (N and D) had more significant events on day 3, while the control group had greater quantification on day 5.

It was also found that the numeric means of the osteoclasts obtained for the experimental groups were greater than for the control group, mainly when day 3 was compared, demonstrating an acceleration in resorption in N and D. There were statistically significant differences when C3 X N3 were compared, and between D3 X N3 ($p < 0.05$). There was no statistically significant difference in the comparison of C3 X D3 ($p > 0.05$). The hypothesis that bone resorption was more evident in N may be due to the fact that anabolic steroids act as growth hormones, acting with a biphasic effect to accelerate resorption and promoting bone deposition later, also corroborating the results of Simpson et al. and Carroll et al. (23, 24).

From the results obtained, greater numeric means were verified for blood vessels in the experimental groups when compared to the control group. Studies related to angiogenesis are scarce in the literature; however, according to Carvalho, there is an increase in the amount of newly formed vessels when AAS are used (25). This increase in blood vessels was also seen in the present study. Subsequent studies should be performed to understand this increase better.

The organization of the collagen fibers on the compression side of the periodontal ligament began on day 5 in the experimental groups; in the control group, this organization was only noticed starting from the fourteenth day following the installation of the orthodontic device. Areas of hyalinization were found in all day of the experiment, independent of time, proving that the use of force was exaggerated, exacerbating the biological effects of force on

the periodontal ligament. In the experimental groups, the hypoxia of the periodontal ligament was reestablished more rapidly than in the control group, since areas of hyalinization were found in the control group until the fourteenth day; and, in the experimental groups, there was a significant reduction of these areas by the seventh day. This suggests that there is a reduction of the remodeling and repair time of the tissue in groups N and D (experimental), compared to group C. Carvalho and Falanga show that there is an increase in the amount of fibroblasts, synthesis of collagens and underlying substance, when used the AAS. This confirms the results regarding the early reorganization of the collagen fibers in the periodontal ligament (20, 25).

We cannot confirm that the use of AAS accelerated the tooth movement. This study only evaluated the possible interactions of AAS in the periodontal ligament. It did not assess if the amount of movement (mesial inclination) of the first upper right molar of the rats was the same in the experimental and control groups.

Studies regarding the interaction of AAS and orthodontic movement have yet to be conducted in greater depth. Orthodontic patients are becoming more discerning regarding esthetics, and many may use these substances during orthodontic treatment. Due to this behavioral change, the interactions of medications and orthodontic treatment must be considered.

CONCLUSION

It is concluded that supra-physiological doses of the anabolic androgenic steroids Nebido® and Deposteron® accelerate the biological effects resulting from induced tooth movement, in rats. There was a change in the amount of osteoclasts, Howship's lacunae and blood vessels, and acceleration in the reorganization of the periodontal ligament.

REFERENCES

1. Ghaphery NA. Performance-enhancing drugs. *Orthop Clin North Am.* 1995 Jul;26(3):433-42.
2. Cunha TSC, N.S.; Moura, M.J.C.S.; Marcondes, F.K. Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2004;40(2):165-79.
3. Faigenbaum AD, Zaichkowsky LD, Gardner DE, Micheli LJ. Anabolic steroid use by male and female middle school students. *Pediatrics.* 1998 May;101(5):E6.
4. Lobo APT. Anabolic androgenic steroids misuse in the city of Sao Paulo: a qualitative study EPM-UNIFESP; 2002.
5. Barrett RL, Harris EF. Anabolic steroids and craniofacial growth in the rat. *Angle Orthod.* 1993 Winter;63(4):289-98.
6. Noda K, Chang HP, Takahashi I, Kinoshita Z, Kawamoto T. Effects of the anabolic steroid nandrolone phenylpropionate on craniofacial growth in rats. *J Morphol.* 1994 Apr;220(1):25-33.
7. Gebhardt A, Pancherz H. The effect of anabolic steroids on mandibular growth. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003 Apr;123(4):435-40.
8. Tanaka OM. Estudos dos efeitos da aplicação de hormônios de crescimento e ratos "Wistar". Rio de Janeiro: FO-UFRJ; 1998.
9. Catlin DH, Murray TH. Performance-enhancing drugs, fair competition, and Olympic sport. *JAMA.* 1996 Jul 17;276(3):231-7.
10. Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, Singh AB, Bhasin D, Berman N, et al. Testosterone dose-response relationships in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 Dec;281(6):E1172-81.
11. Sinha-Hikim I, Artaza J, Woodhouse L, Gonzalez-Cadavid N, Singh AB, Lee MI, et al. Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Jul;283(1):E154-64.
12. Parkinson AB, Evans NA. Anabolic androgenic steroids: a survey of 500 users. *Med Sci Sports Exerc.* 2006 Apr;38(4):644-51.
13. Dal Pizzol TSB, M.M.N.; Carvalho, R.M.A.; Pasqualotti, A.; Maciel, E.N.; Migott, A.M.B. Non-medical use of psychoactive medicines among elementary and high school students em Southern Brazil. *Cad Saúde Pública.* 2006;22(1):109-15.

14. Hardman JG GA, Linbird LE. The pharmacological basis of therapeutics. 9th ed. Gilman's Ga, editor. New York: McGraw-Hill 1996.
15. Wu FC. Endocrine aspects of anabolic steroids. Clin Chem. 1997 Jul;43(7):1289-92.
16. Fracalossi ACC SJM, Consolaro MFM-O, Consolaro, A. Experimental tooth movement in murines: study period and direction of microscopic sections. R Dental Press Ortodont Ortop Facial. 2009;14(1):143-57.
17. Fortunato RS, Rosenthal D, Carvalho DP. [Abuse of anabolic steroids and its impact on thyroid function]. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2007 Dec;51(9):1417-24.
18. dos Santos-Pinto R, Okamoto T, de Castro AL. Pharmacological effect of nandrolone phenylpropionate on the healing of dental extraction wounds: a histological investigation in rats. J Nihon Univ Sch Dent. 1970 Jun;12(2):57-61.
19. Silva EMM. Comparative study of the steroids effects with adrogenic progestacional, and anabolic activities on the cronology of the wound healing process of dental extration. A histological study in rats. Araçatuba: UNESP; 1984.
20. Falanga V, Greenberg AS, Zhou L, Ochoa SM, Roberts AB, Falabella A, et al. Stimulation of collagen synthesis by the anabolic steroid stanozolol. J Invest Dermatol. 1998 Dec;111(6):1193-7.
21. Heller IJ, Nanda R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. An experimental study. Am J Orthod. 1979 Mar;75(3):239-58.
22. Macapanpan LC, Weinmann JP. The influence of injury to the periodontal membrane on the spread of gingival inflammation. J Dent Res. 1954 Apr;33(2):263-72.
23. Simpson H, Savine R, Sonksen P, Bengtsson BA, Carlsson L, Christiansen JS, et al. Growth hormone replacement therapy for adults: into the new millennium. Growth Horm IGF Res. 2002 Feb;12(1):1-33.
24. Carroll PV, Christ ER, Bengtsson BA, Carlsson L, Christiansen JS, Clemmons D, et al. Growth hormone deficiency in adulthood and the effects of growth hormone replacement: a review. Growth Hormone Research Society Scientific Committee. J Clin Endocrinol Metab. 1998 Feb;83(2):382-95.
25. Carvalho ACPO, T. Interferências sistêmicas sobre o processo de reparo em feridas de extração dental. Rev Odont UNESP. 1985;14(1/2):27-33.

FIGURES

LEGEND:

AO/AB – alveolar bone

LP/PL –periodontal ligament

C – cement

D – dentin

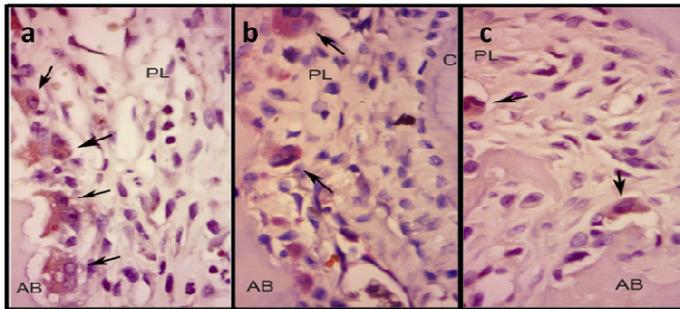


Figure 1. Day 3 a higher number of osteoclast cells (TRAP-positive cells, black arrows) were observed in group D (a), and in group N (b) when compared to control group C (c).

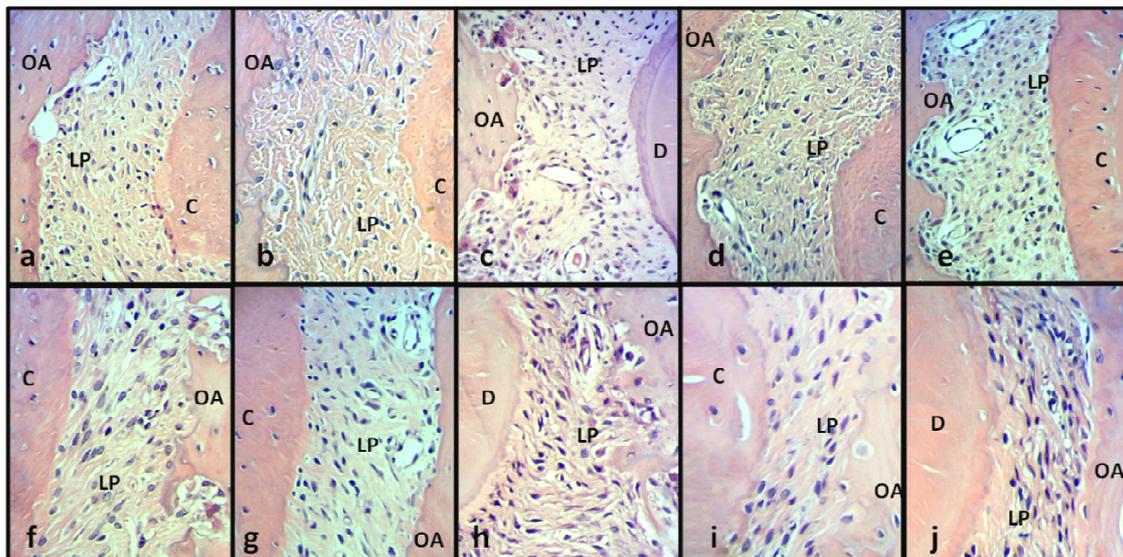


Figure 2. Control group. In a, b, c, d, e compression side of periodontal ligament in 1, 3, 5, 7 e 14 days. In f, g, h, i, j traction side of periodontal ligament in 1, 3, 5, 7 e 14 days respectively.

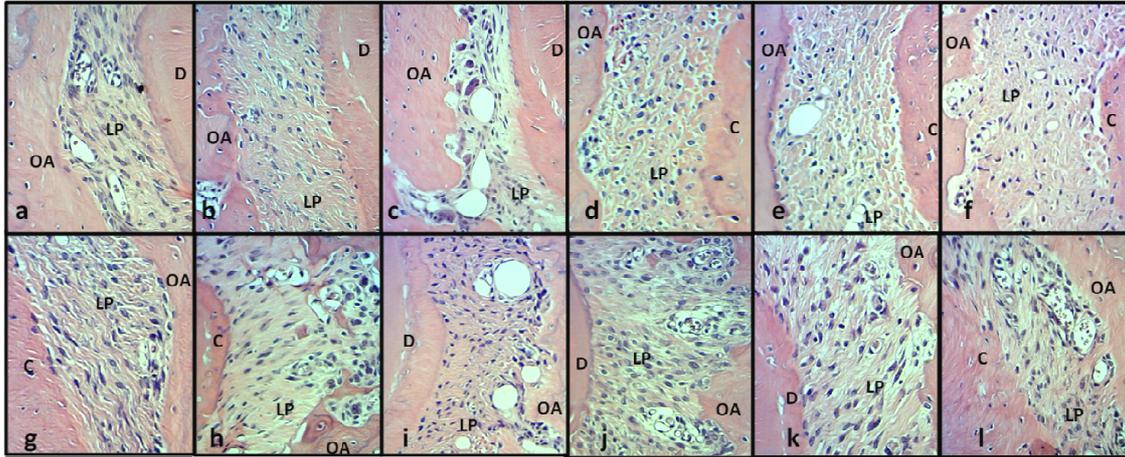


Figure 3. Deposteron Experimental Group. In a, b, c, d, e compression side of periodontal ligament in 0, 1, 3, 5, 7 e 14 days. In g, h, i, j, k j traction side of periodontal ligament in 0, 1, 3, 5, 7 e 14 days respectively.

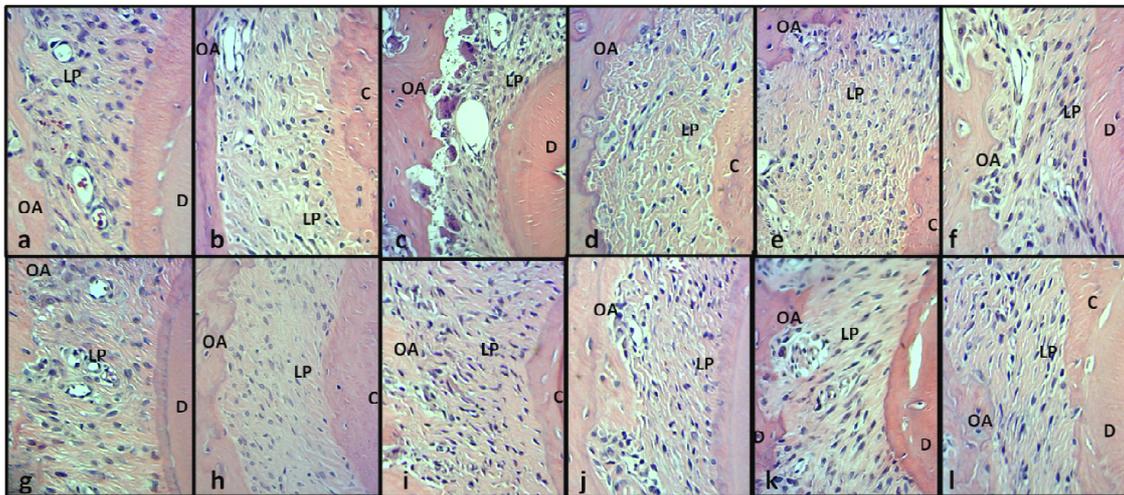


Figure 4. Nebido Experimental Group. In a, b, c, d, e compression side of periodontal ligament in 0, 1, 3, 5, 7 e 14 days. In g, h, i, j, k j traction side of periodontal ligament in 0, 1, 3, 5, 7 e 14 days respectively.

TABLES

Table I: Description of the distribution of the animals and timeline of the death of the animals.

100 rats	Control Group	30 rats	No medication	Death after 1, 2, 3, 5, 7 and 14 days following installation of the orthodontic device
	Nebido Experimental Group	35 rats	AAS Nebido® administered for 20 days before the installation of the orthodontic device	Death after 0, 1, 2, 3, 5, 7, and 14 days following installation of the orthodontic device
	Deposteron Experimental Group	35 rats	AAS Deposteron® administered for 20 days before the installation of the orthodontic device	Death after 0, 1, 2, 3, 5, 7, and 14 days following installation of the orthodontic device

Table II: descriptive analysis of the comparison of 3 variables according to group X time.

TABLE II. DESCRIPTIVE ANALYSIS OF THE COMPARISON OF 3 VARIABLES ACCORDING TO GROUP x TIME.							
VARIABLE	GT	GT	MEAN	S.D.	MEAN	S.D.	p
Osteoclasts	C3	N3	7,4	4,3	14	4,3	0.00097*
	C3	D3	7,4	4,3	9	3,7	0,33659
	N3	D3	14	4,3	9	3,7	0.01579*
Howship's lacunae	C3	N3	17	7,2	22	7,4	0.0029*
	C3	D3	17	7,2	14	7,1	0,2821
	N3	D3	22	7,4	14	7,1	0.0497*
Blood vessels	C3	N3	14,6	4,9	20,4	4,8	0,067298
	C3	D3	4,6	4,9	18	3,2	0,99586
	N3	D3	20,4	4,8	18	3,2	0,99995
SOURCE: Research data.							
LEGEND: GT - group X time; S.D. - Standard Deviation							
NOTE: *Statistically significant value when p<0.05.							

3. ANEXOS

ANEXO 1

Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

NÚCLEO DE BIOÉTICA
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Registro do projeto no CEUA: 492 2ª versão

Data do parecer: 23/10/2009

Título do Projeto:

Efeitos do uso de esteróides anabolizantes no tratamento ortodôntico

Pesquisador responsável:

Odilon Guariza Filho

Equipe da pesquisa:

Lilian Mary Karakida

Maria Cecília Galacini Añez

Instituição:

PUCPR

Categoria do Experimento – C

Espécie de Animal	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
<i>Rattus norvegicus albinus</i>	Macho	9 semanas, 300-350g	180

O colegiado do CEUA em reunião no dia 22/10/2009, 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.



ANEXO 2

Instalação do dispositivo ortodôntico

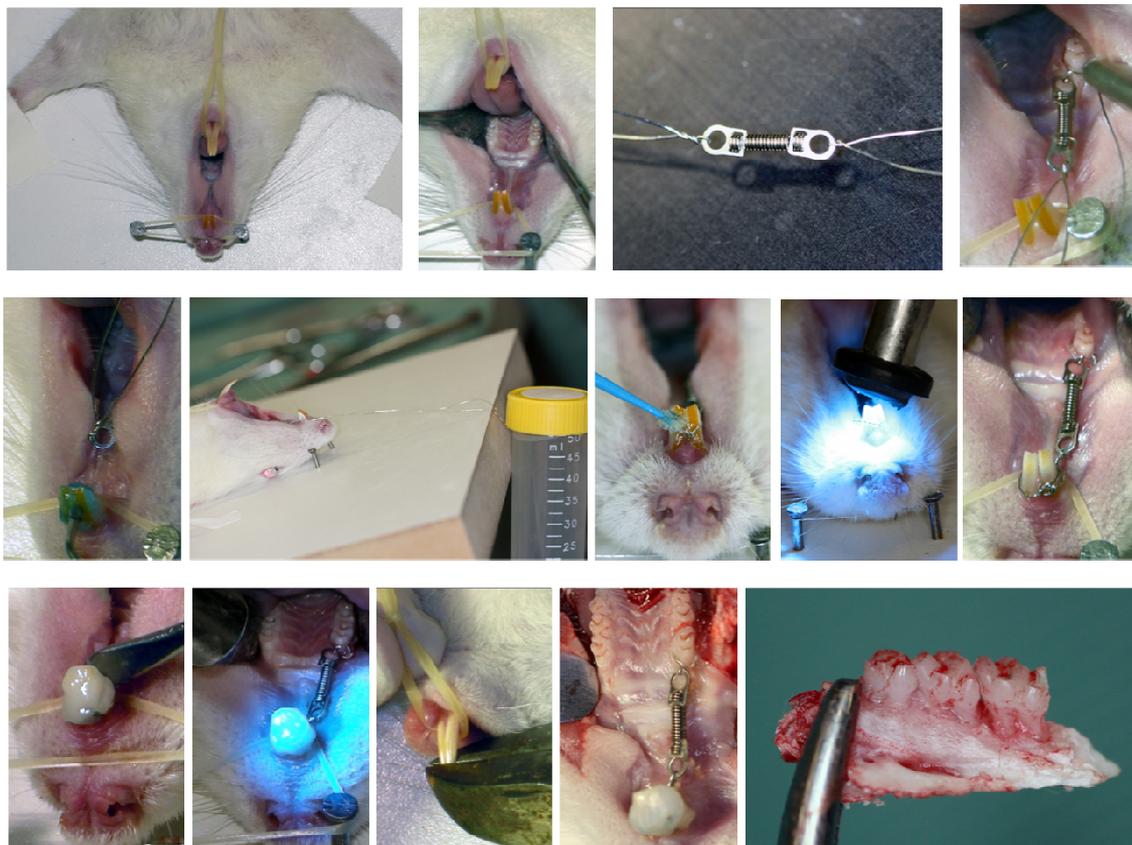


Figura 1: Sequência do procedimento de instalação do dispositivo ortodôntico. Posicionamento do animal em tábua específica, após anestesia. Análise do espaço de trabalho. Mola de *nickel titanium* de 9mm de comprimento. Apreensão do primeiro molar superior direito, com auxílio de uma pinça Mathieu. Condicionamento ácido com ácido fosfórico á 37% por 1 minuto, remoção do ácido com auxílio de uma gaze embebida em água, e secagem realizada com uma gaze seca. Mensuração da força empregada, utilizando-se um peso de 50g, totalizando 50gf equivalente á 50cN; apreensão o amarrilho nos incisivos superiores. Aplicação da camada adesiva. Fotopolimerização por 20 segundos. Análise da estabilidade do dispositivo ortodôntico. Posicionamento da resina para melhor estabilidade da mola. Fotopolimerização da resina. Corte dos incisivos inferiores, para diminuir o risco de contato entre os incisivos inferiores e o dispositivo ortodôntico. Fotografia final. Segmento posterior da hemi-maxila superior do lado direito.

ANEXO 3

Normas para publicação no periódico *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*

Information for Authors

Electronic manuscript submission and review

The *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* uses the *Elsevier Editorial System (EES)*, an online manuscript submission and review system. To submit or review an article, please go to the **AJO-DO** Editorial Manager website: ees.elsevier.com/ajodo.

Send other correspondence to:

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

American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics

University of Washington Department of Orthodontics, D-569

HSC Box 357446

Seattle, WA 98195-7446

Telephone (206)221-5413 (206)221-5413

E-mail: dlturpin@aol.com

General Information

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

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

Statements and opinions expressed in the articles and communications herein are those of the author(s) and not necessarily those of the editor(s) or publisher, and the editor(s) and publisher disclaim any responsibility or

liability for such material. Neither the editor(s) nor the publisher guarantees, warrants, or endorses any product or service advertised in this publication; neither do they guarantee any claim made by the manufacturer of any product or service. Each reader must determine whether to act on the information in this publication, and neither the *Journal* nor its sponsoring organizations shall be liable for any injury due to the publication of erroneous information.

Guidelines for Original Articles

Submit Original Articles via the online Editorial Manager: ees.elsevier.com/ajodo. Organize your submission as follows.

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

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

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

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

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

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

8. Conflict of interest statement. Report any commercial association that might pose a conflict of interest, such as ownership, stock holdings, equity

interests and consultant activities, or patent-licensing situations. If the manuscript is accepted, the disclosed information will be published with the article. The usual and customary listing of sources of support and institutional affiliations on the title page is proper and does not imply a conflict of interest. Guest editorials, Letters, and Review articles may be rejected if a conflict of interest exists.

Other Articles

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

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

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

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

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

Miscellaneous Submissions

Letters to the Editor and Ask Us questions and answers appear in the Readers' Forum section and are encouraged to stimulate healthy discourse

concerning the profession. Send letters or questions directly to the editor, via e-mail: dlturpin@aol.com. Submit a signed copyright release with the letter, or fax or mail separately.

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

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

Checklist for authors

____ Title page, including full name, academic degrees, and institutional affiliation and position of each author, and author to whom correspondence and reprint requests are to be sent, including address, business and home phone numbers, fax numbers, and e-mail address

____ Abstract

____ Article proper, including references and figure legends

____ Figures, in TIF or EPS format

____ Tables

____ Copyright release statement, signed by all authors

____ Photographic consent statement(s)

____ Conflict of interest statement

____ Permissions to reproduce previously published material

Updated June 2009