



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE SAÚDE E BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM ORTODONTIA**

MARCEL DURANTE BRUNET

EFEITOS DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS

CURITIBA

2012

MARCEL DURANTE BRUNET

**EFEITOS DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA
MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA INDUZIDA EM RATOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Odilon Guariza Filho

Coorientadora: Profa. Dra. Aline Cristina Batista
Rodrigues Johann

CURITIBA

2012

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

B895e
2012 Brunet, Marcel Durante
Efeitos do ácido zoledrônico na movimentação dentária induzida em ratos /
Marcel Durante Brunet ; orientador, Odilon Guariza Filho ; coorientadora, Aline
Cristina Batista Rodrigues Johann. – 2012.
51 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2012
Bibliografia: 19-20

1. Movimentação dentária. 2. Reabsorção óssea. 3. Ortodontia. 4.
Odontologia. I. Guariza Filho, Odilon. II. Johann, Alice Cristina Batista
Rodrigues. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-
Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDD 20. ed. – 617.6



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

TERMO DE APROVAÇÃO

MARCEL DURANTE BRUNET

EFEITOS DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NA MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA INDUZIDA EM RATOS

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

Orientador(a):

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

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

Prof.ª Dr.ª Solange Mongelli de Fantini
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, FOUSP

Curitiba, 14 de Dezembro de 2012.

“Os mais poderosos intelectos da Terra não podem compreender a Deus. Os homens podem estar sempre a pesquisar, sempre a aprender, e ainda há, para além, o infinito. Mas se nos entregarmos completamente a Deus, e seguirmos Sua direção em nosso trabalho, Ele mesmo Se responsabilizará pelo cumprimento. Não quer que nos entreguemos a conjeturas sobre o êxito de nossos esforços honestos.”
(Ellen G. White)

A Deus, pelo seu grande amor, por estar ao meu lado aonde eu for, por guiar meus passos, pela vida, saúde, família, proteção, oportunidades, sabedoria, paciência, qualidades, defeitos e paz a mim concedidos.

Aos meus pais João Carlos Brunet e Denise Bellese Durante, meus primeiros mestres, pelo exemplo de responsabilidade, perseverança, honestidade e paciência. Pela compreensão e incentivo creditados a mim em todos os momentos. Por acreditar na minha capacidade e por me ajudar na realização dessa conquista.

A minha noiva, companheira e amiga, Gabriela França Moreira da Silva, sem o seu apoio esta caminhada seria muito mais difícil. Muito obrigado por estar ao meu lado, pelo seu apoio, incentivo e amor em todos os momentos.

Ao meu irmão Marvin Durante Brunet, que esteve comigo nos dias bons e nos dias “não tão bons”.

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

Ao Professor Dr. Odilon Guariza Filho, pelos ensinamentos a mim transmitidos desde o início do curso, amizade, paciência, pela orientação e por acreditar no êxito desta pesquisa.

A Professora Dra. Aline Cristina Batista Johann por toda paciência, cordialidade, inteligência e conhecimentos dispensados. Por me auxiliar no que eu mais precisei, me capacitando a obter novos conhecimentos.

AGRADECIMENTOS

A Professora Dra. Elisa de Souza Camargo pela excelente pessoa e professora, por estar sempre disposta a ajudar, por toda dedicação, por aceitar fazer parte da comissão avaliadora e por ser exemplo de professora e ortodontista.

Ao Professor Dr. Orlando Tanaka por incentivar o senso crítico e por participar ativamente da minha formação ortodôntica.

Ao Professor Dr. Sergio Aparecido Ignácio, pela disposição, paciência e orientação qualificada na análise estatística dessa pesquisa.

A Professora Dra. Solange Mongelli de Fantini por aceitar gentilmente fazer parte da comissão avaliadora deste trabalho.

Aos meus colegas: Ana Paula Lazzari Marques Peron, Bruno Borges de Castilhos, Camila Rychuv Santos, Cristiano Miranda de Araujo, Giovana Carla Franzon Frigoto, Jorge César Borges Leão Filho, José Guilherme Camargo Teixeira da Cunha, Luciana Trevisan Bittencourt Muniz, Regis Meller Santana e Viviane da Silva Kagy, por dividir todos os momentos compartilhados nesses dois anos.

Ao amigo Claudio Sabatoski por nos estimular o conhecimento mais aprofundado nas técnicas ortodônticas e ser exemplo de qualidade, superação e provar que todo esforço traz grandes recompensas.

A todos meus amigos que direta ou indiretamente auxiliaram na minha formação como pessoa e creditaram confiança à minha formação profissional.

Às funcionárias Neide Reis Borges e Maria Nilce Silva Reis pela compreensão e paciência nos momentos conturbados e descontraídos.

Aos funcionários da técnica operatória: Misael Barbosa e Álvaro pela confiança e por permitir o uso dos laboratórios no momento em que precisei.

Às funcionárias do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR Ana Paula Camargo Martins e Marina Luise Viola de Azevedo pela colaboração na realização das lâminas.

A todos os outros funcionários da secretaria, do CAT, clínicas de graduação e esterilização pelo apoio na solução dos problemas do dia a dia.

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

E a todas as outras pessoas que foram importantes para mim e que de alguma maneira contribuíram para minha formação e vida.

SUMÁRIO

1. ARTIGO EM PORTUGUÊS	1
1.1 PÁGINA TÍTULO	1
1.2 RESUMO.....	2
1.3 INTRODUÇÃO	3
1.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	4
1.5 RESULTADOS	9
1.6 DISCUSSÃO	14
1.7 CONCLUSÕES	18
1.8 REFERÊNCIAS	19
2. ARTIGO EM INGLÊS	21
2.1 TITLE PAGE.....	21
2.2 ABSTRACT	22
2.3 INTRODUCTION	23
2.4 MATERIAL AND METHODS.....	24
2.5 RESULTS.....	28
2.6 DISCUSSION	32
2.7 CONCLUSIONS	36
2.8 REFERENCES	37
3. ANEXOS	39
3.1 ANEXO I - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA PUCPR	39
3.2 ANEXO II – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO – AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS.....	40

ARTIGO EM PORTUGUÊS

PÁGINA TÍTULO

Efeitos do Ácido Zoledrônico na Movimentação Dentária Induzida em Ratos

Marcel Durante Brunet, DDS, MSD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.

Escola de Saúde e Biociências

Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Ortodontia

Email: marcelbrunet@gmail.com

Odilon Guariza Filho, DDS, MSD, PhD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.

Escola de Saúde e Biociências

Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Ortodontia

Email: odilongfilho@gmail.com

Aline Cristina Batista Rodrigues Johann, DDS, MSD, PhD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.

Escola de Saúde e Biociências

Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Histopatologia

Email: aline.johann@pucpr.br

Autor correspondente

Prof. Dr. Odilon Guariza Filho

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.

Escola de Saúde e Biociências

Professor, Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Ortodontia

Rua Imaculada Conceição, 1155, Bairro Prado Velho, CEP 80215-901 – Curitiba, PR

Email: odilongfilho@gmail.com

RESUMO

Introdução: O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos decorrentes da administração do Ácido Zoledrônico (AZ) em ratos durante o movimento dentário.

Métodos: Em noventa ratos Wistar machos, foi aplicada força de 30 cN com mola fechada de níquel-titânio para movimentar o primeiro molar superior direito para mesial. No grupo CM foi realizado somente movimento dentário, o grupo CAZ recebeu dose única (0.1mg/Kg) de AZ e o grupo EAZ recebeu dose única (0.1mg/Kg) de AZ uma semana antes do início do movimentação dentária. Os animais foram eutanasiados após 3, 7 e 14 dias. Foram mensurados a movimentação dentária, com auxílio de paquímetro digital, o número de osteoclastos por meio da coloração TRAP, a porcentagem do colágeno maduro e imaturo por meio da coloração Picrosírius e a presença de área hialina e reabsorção radicular por meio de HE. Os dados foram comparados por ANOVA a dois critérios, Tukey HSD, Games-Howell e Teste de Qui-quadrado, ao nível de significância de 5%. **Resultados:** Verificou-se menor numero de osteoclastos, tendência à diminuição do movimento dentário com o tempo e maior porcentagem de área hialina no grupo EAZ. Não houve diferença entre grupos quanto à neoformação óssea e reabsorção radicular em todos os tempos observados. **Conclusões:** O Ácido Zoledrônico apresenta tendência a inibir a movimentação dentária pois dificulta a reabsorção óssea.

DESCRITORES (DeCS)

Bifosfonatos, Movimentação Dentária, Ortodontia, Ratos Wistar.

INTRODUÇÃO

Bifosfonatos administrados via oral ou intravenosa são amplamente utilizados para o tratamento de determinadas doenças ósseas metabólicas, tais como a doença de Paget, osteogênese imperfeita, displasia fibrosa, Doença de Gaucher, hipercalcemia maligna, osteopenia e osteoporose.¹⁻³

Estes fármacos podem vincular os cristais de hidroxiapatita em uma matriz óssea mineralizada e tornar o osso mais resistente aos osteoclastos, aliado a isso, inibir a função e induzir a apoptose dos osteoclastos, assim, inibindo a remodelação óssea.^{1,3-5}

Além disso, não só restringem a atividade dos osteoclastos, mas também mostram efeitos osteocondutor e osteoindutor pelo aumento da atividade osteoblástica.⁶⁻⁸

O Ácido Zoledrônico (AZ) é um potente e inovador bifosfonato de terceira geração, que contém nitrogênio. É administrado por via intravenosa, com rápida absorção e concentração nas estruturas da maxila e mandíbula, sendo considerado o mais potente inibidor da reabsorção óssea comparado com outros bifosfonatos que estão atualmente disponíveis.^{4,9}

Este fármaco apresenta grande afinidade pelo cálcio no osso e tem sua meia vida intraóssea de aproximadamente 10 anos, sendo possível os seus efeitos sobre a remodelação e reparação óssea possíveis por tempo prolongado. Pondendo ainda afetar os usuários por muitos anos, mesmo depois de terem seu uso interrompido.^{10,11}

Complicações conhecidas da utilização de bifosfonatos são a diminuição da cicatrização óssea e a capacidade de poder inibir a movimentação dentária. A inibição da movimentação dentária poderá ocorrer devido à diminuição da atividade osteoclástica limitando a remodelação e reparo ósseo.¹⁰

O uso de bifosfonatos por pacientes adultos tem sido mais difundido, portanto aumentar o nosso conhecimento sobre os bifosfonatos é fundamental, pois esses fármacos têm o potencial de poder inibir a movimentação dentária.^{3,11}

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar: a) a reabsorção óssea; b) a porcentagem do colágeno tipos I e III do osso alveolar; c) a taxa de movimentação dentária; d) a presença de áreas hialinas; e) a presença de reabsorção radicular; durante o movimento ortodôntico em ratos submetidos ao uso de Ácido Zoledrônico.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob parecer nº 628.

Distribuição da Amostra

Foi constituída por 90 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com nove semanas de vida, pesando aproximadamente 300 – 350g, provenientes do Biotério da PUCPR.

Após cálculos estatísticos apropriados, os animais foram distribuídos em três grupos, da seguinte maneira:

O grupo controle movimentação (CM) foi constituído por 30 animais, nos quais não se administrou nenhum fármaco e foi realizada somente movimentação dentária à força de 30 cN.^{12,13}

O grupo Controle Ácido Zoledrônico (CAZ) foi constituído por 30 animais, nos quais foi administrado Ácido Zoledrônico (Aclasta™, Novartis® Biociências S.A., Stein, Switzerland) via intraperitoneal, em dose única (0.1mg/Kg)^{1,14-16}, sem aplicação da movimentação dentária.

O grupo Experimental Ácido Zoledrônico (EAZ) foi constituído por 30 animais, que foram submetidos à força ortodôntica de 30 cN,^{13,14} sob administração do fármaco Ácido Zoledrônico (Aclasta™, Novartis® Biociências S.A., Stein, Switzerland) via intraperitoneal em dose única (0.1mg/Kg)^{1,14-16} uma semana antes do início da movimentação dentária.

Cada grupo foi subdividido nos tempos 3, 7 e 14 dias, após início da movimentação dentária,^{17,18} cada dia com 10 animais.

Anestesia dos Animais e Preparo do Dispositivo Ortodôntico

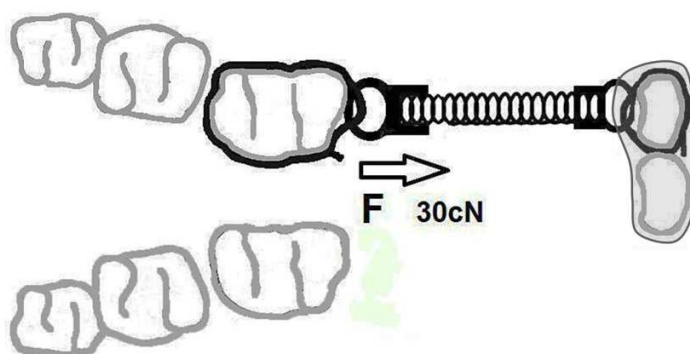
Na realização do procedimento de instalação do dispositivo ortodôntico os animais foram sedados com Tiletamina/Zolazepan (Zoletil 50®, Virbac Brasil Indústria e Comércio Ltda, Jurubatuba, SP, Brasil), na dosagem de 50 mg/kg via intramuscular.

O dispositivo ortodôntico consistiu em uma mola de *nickel titanium* fechada (G&H® Wire Orthodontics, Franklin, IN) e fio de amarrilho de aço inoxidável com 0,25 mm de espessura, utilizado para fixação da mola no primeiro molar direito e nos incisivos da maxila dos animais.¹⁹

Instalação e Ativação dos Dispositivos Ortodônticos

O fio de amarrilho foi análogo a uma banda circundando a coroa do primeiro molar e ao mesmo tempo fixando uma das extremidades da mola. A outra extremidade foi unida ao incisivo superior do mesmo lado, por meio de fio de amarrilho e resina composta (Charisma®, Heraeus Kulzer, Hanau, Germany) (Figura 1). A mensuração da força (30cN) produzida pela mola foi padronizada com tensiômetro (Haag-Streit AG, Koeniz, Switzerland).

Fig 1. Desenho esquemático do dispositivo ortodôntico instalado



Aferição da Taxa de Movimentação Dentária

A taxa de movimentação dentária foi aferida com paquímetro digital (Absolute-Mitutoyo, Kawasaki-Shi, Japan), antes da instalação da mola e imediatamente após o sacrifício dos animais, em todos os períodos de observação (3, 7 e 14 dias). Foi aferida a distância entre a face palatina do incisivo superior direito e a face mesial do primeiro molar superior direito.¹⁷

Processamento Histotécnico e Análise Histológica

Após 3, 7 e 14 dias da instalação da mola os animais foram eutanasiados por overdose de solução anestésica.¹³

Posteriormente à eutanásia, a maxila de cada animal foi removida, dissecada e seccionada na linha média. A hemi-maxila direita foi fixada em formol a 10% por 24 horas e desmineralizada com EDTA 5%, por dois meses.

Após a completa desmineralização, os espécimes foram processados e emblocados no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR. Foram obtidas cinco secções transversais a partir do terço cervical da raiz mésio-vestibular do primeiro molar, cortados em micrótomo com 4 µm de espessura, com intervalo de 60 µm entre cada secção. Estes cortes foram corados pelas técnicas de coloração de Hematoxilina e Eosina, Picrosírius Red e pela técnica histoquímica Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (TRAP).²⁰ A enzima TRAP é considerada marcador pontual de osteoclastos e pode ser utilizada para determinar quantitativamente, a reabsorção óssea.²¹ A coloração por TRAP foi realizada usando o kit TRAP 387 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) seguindo as instruções do fabricante. De cada secção, foram capturadas cinco imagens da região mesial da raiz mésio-vestibular do primeiro molar (área de compressão), compreendendo uma área total de 942.813,00µm² utilizando microscópio Olympus BX-50 (Olympus, Tóquio, Japão) acoplado a microcâmera Dinolite® AM 423X (AmMo Eletronics Corporation, New Taipei City, Taiwan) em magnificação de 400X.²⁰ Os parâmetros de aquisição da imagem foram fixados durante o processo de captura. A contagem do número de osteoclastos foi realizada com auxílio do programa de morfometria Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), onde foi criada uma grade para

contagem. Foram consideradas osteoclastos as células multinucleadas, TRAP-positivas e localizadas adjacentes ao tecido ósseo. Para a obtenção do número de osteoclastos primeiro somou-se os osteoclastos das cinco imagens e posteriormente calculou-se a média das cinco secções.²⁰ (Figura 2)

A presença ou ausência de áreas hialinas e reabsorção óssea foram identificadas utilizando lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (Figura 4), por intermédio de microscópio de luz Olympus BX-50 (Olympus, Tóquio, Japão) acoplado a microcâmera Dinolite® AM 423X (AmMo Eletronics Corporation, New Taipei City, Taiwan).

A neoformação da matriz orgânica óssea no lado de tração foi verificada nas lâminas coradas com Picrosírius. Uma área na distal da referida raiz de cada secção foi selecionada e uma imagem capturada por intermédio de microscópio de luz Olympus BX-50 (Olympus, Tóquio, Japão) acoplado à microcâmera Dinolite® AM 423X (AmMo Eletronics Corporation, New Taipei City, Taiwan) e a uma lente polarizadora (Olympus U-P110) com magnificação de 100x.^{17,18} As imagens foram editadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop® CS6® (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA) no qual ligamento periodontal e o dente foram apagados selecionando apenas o tecido ósseo. O sistema de análise automático Image Pro Plus 4,5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) foi utilizado para medir a porcentagem das áreas de colágeno maduro e imaturo.^{18,22} A porcentagem de cada tipo de colágeno para cada animal foi obtida pela média das cinco secções.

Contra fundo preto, as fibras espessas, ordenadas, fortemente aderidas e com coloração vermelha representam o colágeno maduro (tipo I); as fibras mais finas, desorganizadas, frouxas e com coloração esverdeada, correspondem ao colágeno imaturo (tipo III).^{17,18,22} (Figura 3)

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa SPSS 19.0 (SPSS, Chicago, IL). Visando comparar se existia diferença nos valores médios das variáveis: colágeno tipo I no osso, colágeno tipo III no osso, taxa de movimentação dentária e número de osteoclastos segundo grupo e tempo, foi testada a normalidade dos dados utilizando o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias utilizando do teste de Levene. Observou-se que apenas um tratamento não apresentou distribuição normal ($p < 0,05$). A comparação dos valores médios entre grupo, tempo e a interação grupo x tempo foi realizada utilizando ANOVA a dois critérios, modelo fatorial completo. Quando ANOVA indicou existir diferença entre qualquer um dos dois fatores e o teste de Levene indicou variâncias homogêneas, a comparação dos tratamentos 2 a 2 foi feita utilizando o teste de comparações múltiplas paramétricas de Tukey HSD para variâncias homogêneas; caso contrário utilizou-se o teste de comparações múltiplas paramétricas de Games-Howell para variâncias heterogêneas. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

Visando avaliar se existia dependência entre presença ou ausência de área hialina e de reabsorção radicular segundo grupo, tempo e a interação grupo x tempo utilizou-se o teste de Qui-quadrado, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Reabsorção Óssea

Utilizando o teste de comparações múltiplas de Games-Howell para a variável grupo x tempo, foi observado que o grupo CM apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação aos grupos CAZ e EAZ em todos os tempos de observação (3, 7 e 14 dias). O grupo CM apresentou maior quantidade de osteoclastos que os grupos em que houve a administração do AZ, indicando que no grupo sem o fármaco a quantidade de reabsorção óssea foi maior. (Gráfico I, Tabela I e Figura 2).

Tabela I. Média, Desvio padrão e Valor de p das variáveis: número de osteoclastos, porcentagem de colágeno tipo I, porcentagem de colágeno tipo III e taxa de movimentação dentária nos grupos controle movimentação (CM), controle Ácido Zoledrônico (CAZ) e experimental (EAZ) nos dias 3, 7 e 14.

Variáveis/ Dias	Média ± DP			Valor de p		
	CM	CAZ	EAZ	CM x CAZ	CM x EAZ	CAZ x EAZ
Osteoclastos						
3	17,56 ± 7,71	2,79 ± 1,98	2,89 ± 2,00	0,0062	0,0443	1,0000
7	11,79 ± 7,00	1,98 ± 1,64	2,87 ± 1,09	0,0269	0,0453	0,9042
14	13,79 ± 4,05	1,51 ± 0,98	1,96 ± 0,50	0,0001	0,0001	0,9345
Colágeno Tipo I						
3	78,00 ± 11,71	78,23 ± 16,78	80,68 ± 16,69	0,0964	0,2545	0,2498
7	78,21 ± 12,35	80,84 ± 19,96	83,12 ± 10,32	0,1990	0,1353	0,2000
14	80,47 ± 8,97	87,35 ± 5,28	82,66 ± 12,89	0,2234	0,1926	0,1923
Colágeno Tipo III						
3	22,00 ± 11,71	21,77 ± 16,78	19,32 ± 16,69	0,0964	0,2545	0,2498
7	21,79 ± 12,35	19,16 ± 19,96	16,88 ± 10,32	0,1990	0,1353	0,2000
14	19,53 ± 8,97	12,65 ± 5,28	17,34 ± 12,89	0,2234	0,1926	0,1923
Movimentação Dentária						
3	4,17 ± 3,65		8,22 ± 4,92	0,8724	0,5123	0,0696
7	5,56 ± 4,37		6,94 ± 4,33	0,1595	0,9979	0,0376
14	9,56 ± 6,05		6,92 ± 2,72	0,0402	0,9263	0,0024

Teste de Games-Howell à significância de 5%.

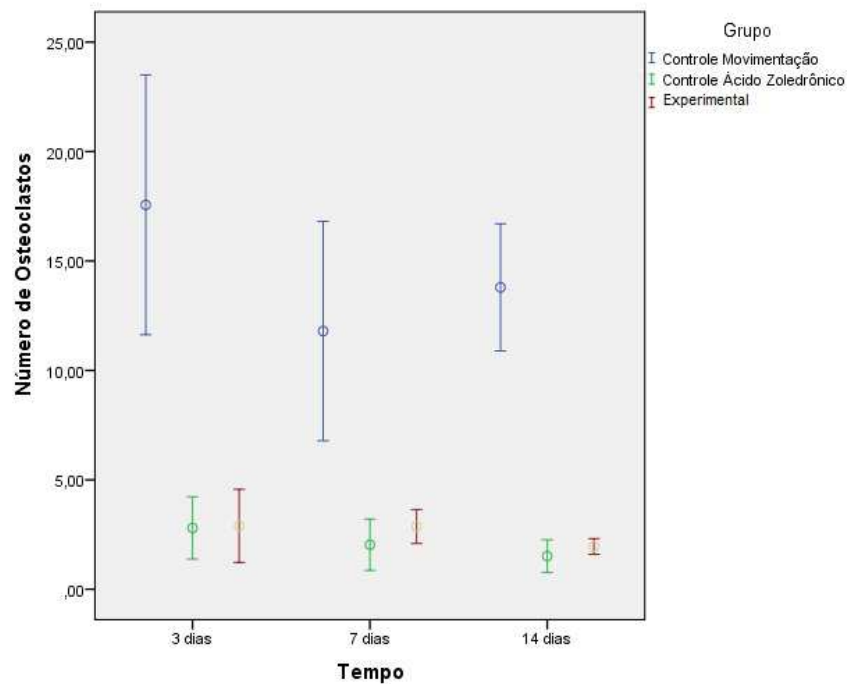


Gráfico I. Comparação entre grupos x tempo da variável número de osteoclastos.

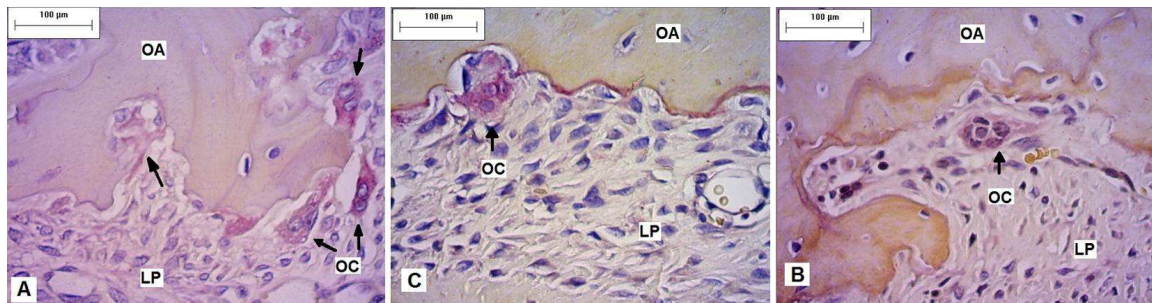


Fig 2. Período de 14 dias, maior número de osteoclastos (células positivas para TRAP - setas pretas) foi observado no grupo CM **(A)** quando comparado com os grupos CAZ **(B)** e EAZ **(C)**. OA, Osso Alveolar; LP, Ligamento Periodontal; OC Osteoclastos (coloração TRAP, magnificação 400X)

Neoformação Óssea

Ao avaliarmos a porcentagem de colágeno tipo I e III no osso, utilizando o teste de comparações múltiplas de Games-Howell, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre grupos em todos os tempos de observação (3, 7 e 14 dias). (Tabela I e Figura 3)

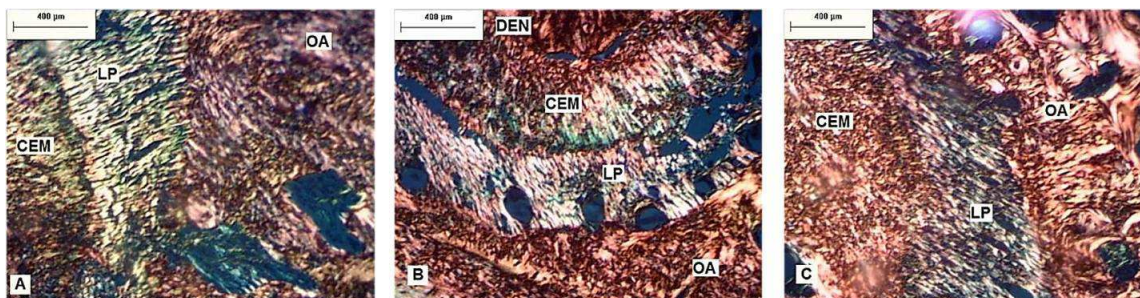


Fig 3. Período de 14 dias, não foi observada diferença na coloração do colágeno no osso nos grupos: CM **(A)**, CAZ **(B)**, e EAZ **(C)** em todos os tempos de observação. OA, Osso Alveolar; LP, Ligamento Periodontal; DEN, Dentina; CEM, Cimento (coloração Picrosírius, magnificação 100X)

Taxa de Movimentação Dentária

Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os grupos CM e EAZ (grupos com movimentação dentária) nos três períodos de observação (3, 7 e 14 dias), ao utilizarmos o teste de comparações múltiplas de Games-Howell (Tabela I).

Porém foi observada tendência a aumento gradual da taxa de movimentação dentária no grupo CM em todos os períodos de observação. Por outro lado, no grupo EAZ foi observada tendência à diminuição gradual da taxa de movimentação dentária nos tempos de 3, 7 e 14 dias. (Gráfico II)

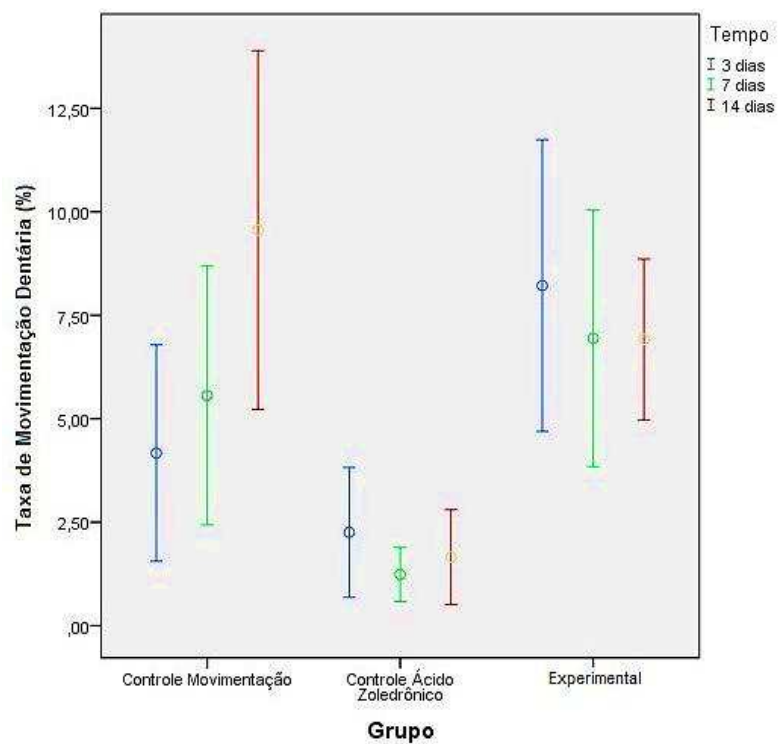


Gráfico II. Taxa de Movimentação Dentária em função de grupo e tempo.

Áreas Hialinas

No tempo de 7 dias notou-se que o grupo EAZ apresenta maior presença de áreas hialinas (90%) quando comparado ao grupo CM (10%).

Nos tempos de 3 e 14 dias não foi observado diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Tabela II).

Tabela II. Porcentagem e Valor de p da presença de área hialina e reabsorção radicular nos grupos controle movimentação (CM), controle Ácido Zoledrônico (CAZ) e experimental (EAZ) nos dias 3, 7 e 14.

Variáveis	Dias	Porcentagem (%)			Valor de p		
		CM	CAZ	EAZ	CM x CAZ	CM x EAZ	CAZ x EAZ
Área Hialina	3	33	0	75	0,0322	0,0519	0,002
	7	10	0	90	0,1592	0,0011	0,0004
	14	60	0	50	0,006	0,3292	0,0122
Reabsorção Radicular	3	0	40	25	0,0238	0,0656	0,256
	7	40	30	70	0,3224	0,0971	0,0462
	14	80	67	60	0,2642	0,171	0,3779

Teste Qui-Quadrado. Significância de 5%

Reabsorção Radicular

Na comparação dos grupos CM e EAZ não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) em todos os tempos avaliados (Tabela II).



Fig 4. Período de 14 dias, áreas hialinas e reabsorção radicular nos grupos: CM (A), CAZ (B), e EAZ (C). AH, Área Hialina; RR, Reabsorção Radicular; OA, Osso Alveolar; LP, Ligamento Periodontal; DEN, Dentina; CEM, Cimento (coloração Hematoxilina e Eosina, magnificação 100X)

DISCUSSÃO

Os bifosfonatos inibem a atividade osteoclástica e a microcirculação, podendo inibir a movimentação dentária.^{3,8,20} Neste estudo foi utilizado o fármaco Ácido Zoledrônico por se tratar de um inovador Bisfosfonato, e sua relação com a movimentação dentária é ainda pouco estudada.²³

O Ácido Zoledrônico é administrado em humanos em dose única, e repetido anualmente conforme as necessidades de cada paciente. Ele tem a característica de rápida absorção e concentração nas estruturas da maxila e da mandíbula, podendo permanecer no organismo por até 10 anos. Com o intuito de avaliarmos os efeitos do Ácido Zoledrônico nas estruturas periodontais, no decorrer do tempo, a aplicação do fármaco se deu uma semana antes da instalação do dispositivo ortodôntico da mesma forma que em outras pesquisas.^{1,14-16}

Nos grupos CAZ e EAZ observou-se menor número de osteoclastos em relação ao grupo CM, em todos os períodos de tempo observados, não apresentando variação com o passar do tempo (Tabela I). Este resultado representa diminuição na atividade osteoclástica, conseqüentemente diminuindo a remodelação óssea, sendo semelhante aos de pesquisas anteriores de Ozturk et al¹ e Huja et al⁴, que utilizaram o Ácido Zoledrônico em ratos e cachorros respectivamente.^{1,4}

Diante da interpretação dos resultados desta pesquisa é possível sugerir que o medicamento teve eficácia, uma vez que tem por papel, inibir a função e induzir a apoptose dos osteoclastos.^{1,3-5}

Estudos comprovam que após a aplicação da força ortodôntica, células e fibras colágenas são comprimidas e estiradas, nos lados de compressão e tração, respectivamente. O processo biológico prossegue com o recrutamento de osteoclastos e osteoblastos e remodelação do osso alveolar.^{18,20,24}

Neste estudo buscou-se também avaliar as mudanças estruturais na matriz trabecular óssea neoformada na presença simultaneamente de movimentação dentária e Ácido Zoledrônico por meio do método de Picrosírius com uso de luz polarizada, sendo possível detectar as fibras de colágeno maduro e imaturo e

correlacionar à distribuição tridimensional das fibras colágenas com o estágio de formação óssea (Figura 3).²⁵

A matriz orgânica do osso alveolar é composta fundamentalmente por colágeno tipo I (95% da matriz orgânica). A neoformação óssea resulta de eventos complexos e interdependentes, que envolvem desde a diferenciação dos osteoblastos a partir de células mesenquimais primitivas, a síntese da matriz orgânica, sua maturação, até completa mineralização.¹⁷

Os resultados encontrados neste estudo mostram que os grupos submetidos ao uso do Ácido Zoledrônico não apresentaram diferença em relação ao grupo sem o uso do medicamento ($p>0,05$), em todos os tempos observados, para a porcentagem de colágeno tipo I e III no osso alveolar (Tabela I), portanto o Ácido Zoledrônico não interferiu no processo de neoformação óssea.

Kubek et al.²⁶ no seu estudo realizado em ratos que foram submetidos à aplicação de Ácido Zoledrônico, notou que o tratamento suprimiu significativamente a remodelação medular nos ossos dos maxilares.²⁶

Considerando que o Ácido Zoledrônico é amplamente absorvido nas estruturas ósseas dos maxilares,^{4,9} os resultados encontrados neste estudo diferiram dos de Kubek et al.²⁶, possivelmente pelo fato destes autores terem realizado a aplicação do fármaco em duas doses via intravenosa, possibilitando assim as estruturas ósseas dos maxilares, que são altamente irrigadas, terem maior concentração do fármaco. Ainda, os animais daquela pesquisa eram do sexo feminino e ovariectomizadas, e nessa situação, apresentam comportamento semelhante a mulheres na fase da pós-menopausa, fase em que estão mais propensas a osteoporose, apresentando maior remodelação óssea.²⁶

Pacientes em tratamento ortodôntico usuários de bifosfonatos apresentam redução na movimentação dentária.^{3,5,19} Sabendo-se desta possibilidade objetivou-se avaliar a taxa de movimentação dentária, contudo os resultados encontrados não mostraram diferença ($p>0,05$) em todos os grupos nos períodos avaliados. Porém observou-se tendência à diminuição da quantidade de movimentação dentária com o passar dos dias no grupo EAZ quando comparado com o grupo CM (Gráfico II).

Choi et al¹⁹, encontraram redução da quantidade de movimentação dentária em ratos machos e fêmeas com utilização do bisfosfonato Clodronato.¹⁹

O movimento dentário tem se mostrado maior em ratas ovariectomizadas pois estas apresentam comportamento semelhante a mulheres portadoras de osteoporose, doença na qual o osso se torna mais poroso facilitando o movimento do dente no periodonto. Sirinsoontorn et al⁵ encontraram no seu estudo redução no movimento dentário nestes animais.⁵

Apesar de se ter observado apenas uma tendência à redução na taxa de movimentação dentária, vemos que os resultados encontrados no presente estudo foram semelhantes aos de pesquisas anteriores. Com isso podemos perceber que o Ácido Zoledrônico reduz a quantidade de movimentação dentária.

A força aplicada no dente durante a movimentação dentária comprime os vasos do ligamento periodontal, gera hipóxia e, conseqüentemente, fuga e/ou morte celular. A matriz extracelular altera a relação bioquímica e organizacional dos seus componentes resultando em áreas de maior concentração proteica, com união de densos feixes de fibras colágenas. Isso resulta em áreas microscopicamente pobres em células e de aspecto eosinófilo homogêneo, denominadas áreas hialinas da matriz extracelular.²⁷

Conforme a tabela II, o grupo EAZ apresentou maior porcentagem de áreas hialina (90%) quando comparado com o grupo CM (10%) no tempo de 7 dias, mas nos demais tempos não foram observadas diferenças.

Esta diferença na presença de áreas hialinas no tempo de 7 dias ocorreu juntamente com a diminuição na quantidade de áreas hialinas no grupo CM e aumento na presença de áreas hialinas no grupo EAZ, podendo indicar que na fase da reparação óssea em que as áreas hialinas tendem a diminuir em animais sem o uso do fármaco, o Ácido Zoledrônico interferiu na presença das áreas hialinas aumentando a sua presença.

A reabsorção radicular é um efeito adverso do tratamento ortodôntico muito conhecido.²⁸ Ao avaliar as condições do dente e periodonto de ratos submetidos à movimentação ortodôntica é relatada a presença de áreas de reabsorção radicular.^{28,29}

No presente estudo os animais dos grupos CM e EAZ não apresentaram diferença na quantidade de reabsorção radicular ($p>0,05$) em todos os tempos observados, portanto sugere-se que o uso deste fármaco não influencia a reabsorção radicular.

Contrários aos resultados do presente estudo, a literatura relata que sob efeito de bifosfonatos, ratos que foram submetidos à movimentação dentária, apresentaram diminuição da reabsorção radicular.^{5,30} Mori et al.³⁰ observaram diminuição na reabsorção radicular em ratos onde o Ácido Zoledrônico foi aplicado de maneira ativa sobre a superfície radicular de dentes reimplantados, e não de forma sistêmica intraperitoneal como neste estudo.³⁰

Em outro estudo Sirisoontorn et al.⁵ relataram que ratas ovariectomizadas, submetidas ao movimento dentário e sob efeito do Ácido Zoledrônico apresentaram diminuição da reabsorção radicular em relação a ratas que não utilizaram o fármaco.⁵ A diferença nos resultados encontrados pode ter ocorrido pelo fato de Sirisoontorn et al.⁵ terem comparado a quantidade de reabsorção entre ratas ovariectomizadas e ratas não ovariectomizadas. As ratas ovariectomizadas tem maior propensão a apresentar reabsorção radicular do que ratas não ovariectomizadas, desta forma pode-se sugerir que o fármaco não tenha influenciado, e a quantidade de reabsorção radicular que já era superior apenas se manteve.⁵

Devido à grande demanda por tratamento ortodôntico em adultos e o uso do Ácido Zoledrônico ser mais difundido entre esses pacientes, o ortodontista deve informá-los acerca dos possíveis efeitos adversos deste fármaco e da possibilidade de maior tempo de tratamento, uma vez que deve-se recomendar maior intervalo entre as ativações do aparelho, considerando a influência do fármaco na reabsorção óssea.³ Deve-se ainda ter o cuidado de incluir na anamnese questões sobre os fármacos utilizados pelos pacientes, tendo em vista que os mesmos podem influenciar no movimento dentário, mesmo por muitos anos após a interrupção do seu uso.

CONCLUSÕES

- a) Os animais apresentaram menor numero de osteoclastos e consequentemente menor reabsorção óssea na movimentação dentária sob efeito do Ácido Zoledrônico.
- b) O osso alveolar não apresentou alterações na neoformação óssea quando utilizado o Ácido Zoledrônico.
- c) Quando sob efeito do Ácido Zoledrônico a taxa de movimentação dentária teve tendência a diminuir com o decorrer dos dias.
- d) Foi observada maior porcentagem de áreas hialinas na movimentação dentária sob efeito do Ácido Zoledrônico no tempo de 7 dias.
- e) A quantidade de reabsorção radicular foi semelhante nos animais que usaram o Ácido Zoledrônico quando comparado com aqueles sob efeito do fármaco.

REFERÊNCIAS

1. Ozturk F, Babacan H, Gumus C. Effects of zoledronic acid on sutural bone formation: a computed tomography study. *Eur J Orthod* 2012;34:141-146.
2. Matos MA, Araujo FP, Paixao FB. The effect of zoledronate on bone remodeling during the healing process. *Acta Cir Bras* 2007;22:115-119.
3. Rinchuse DJ, Sosovicka MF, Robison JM, Pendleton R. Orthodontic treatment of patients using bisphosphonates: a report of 2 cases. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007;131:321-326.
4. Huja SS, Kaya B, Mo X, D'Atri AM, Fernandez SA. Effect of zoledronic acid on bone healing subsequent to mini-implant insertion. *Angle Orthod* 2011;81:363-369.
5. Sirisoontorn I, Hotokezaka H, Hashimoto M, Gonzales C, Luppapornlarp S, Darendeliler MA et al. Orthodontic tooth movement and root resorption in ovariectomized rats treated by systemic administration of zoledronic acid. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012;141:563-573.
6. Altundal H, Gursay B. The influence of alendronate on bone formation after autogenous free bone grafting in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:285-291.
7. Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 2004;25:4105-4115.
8. Pampu AA, Dolanmaz D, Tuz HH, Avunduk MC, Kisnisci RS. Histomorphometric evaluation of the effects of zoledronic acid on mandibular distraction osteogenesis in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66:905-910.
9. Cheer SM, Noble S. Zoledronic acid. *Drugs* 2001;61:799-805; discussion 806.
10. Kimmel DB. Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Dent Res* 2007;86:1022-1033.
11. Zahrowski JJ. Bisphosphonate treatment: an orthodontic concern calling for a proactive approach. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007;131:311-320.
12. Retamoso L, Knop L, Shintcovsk R, Maciel JV, Machado MA, Tanaka O. Influence of anti-inflammatory administration in collagen maturation process during orthodontic tooth movement. *Microsc Res Tech* 2011;74:709-713.
13. 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;40:827-830.
14. Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. The rat as a model for orthodontic tooth movement--a critical review and a proposed solution. *Eur J Orthod* 2004;26:483-490.
15. Luégia Amorim Henriques Knop RLS, Luciana Borges Retamoso, Jucienne Salgado Ribeiro and Orlando Motohiro Tanaka. Non-steroidal and steroidal anti-inflammatory use in the context of orthodontic movement. *The European Journal of Orthodontics* 2011.
16. Little DG, Peat RA, McEvoy A, Williams PR, Smith EJ, Baldock PA. Zoledronic acid treatment results in retention of femoral head structure after traumatic osteonecrosis in young Wistar rats. *J Bone Miner Res* 2003;18:2016-2022.

17. Amanat N, McDonald M, Godfrey C, Bilston L, Little D. Optimal timing of a single dose of zoledronic acid to increase strength in rat fracture repair. *J Bone Miner Res* 2007;22:867-876.
18. Pereira FRA, Dutra, R.C. Effects of zoledronic acid on ooforectomized rats tibia: a prospective and randomized study. *Rev Bras Ortopedia* 2009;44:61-68.
19. Choi J, Baek SH, Lee JI, Chang YI. Effects of clodronate on early alveolar bone remodeling and root resorption related to orthodontic forces: a histomorphometric analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;138:548 e541-548; discussion 548-549.
20. Braga SM, Taddei SR, Andrade I, Jr., Queiroz-Junior CM, Garlet GP, Repeke CE et al. Effect of diabetes on orthodontic tooth movement in a mouse model. *Eur J Oral Sci* 2011;119:7-14.
21. Galvao MJ, Santos A, Ribeiro MD, Ferreira A, Nolasco F. Optimization of the tartrate-resistant acid phosphatase detection by histochemical method. *Eur J Histochem* 2011;55:e1.
22. Marquezan M, Bolognese AM, Araujo MT. Effects of two low-intensity laser therapy protocols on experimental tooth movement. *Photomed Laser Surg* 2010;28:757-762.
23. Graham JW. Bisphosphonates and orthodontics: Clinical implications. *J Clin Orthod* 2006;40:425-428; quiz 419.
24. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129:469 e461-432.
25. Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Hofling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochem Photobiol B* 2003;70:81-89.
26. Kubek DJ, Burr DB, Allen MR. Ovariectomy stimulates and bisphosphonates inhibit intracortical remodeling in the mouse mandible. *Orthod Craniofac Res* 2010;13:214-222.
27. Igarashi K, Mitani H, Adachi H, Shinoda H. Anchorage and retentive effects of a bisphosphonate (AHBuBP) on tooth movements in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1994;106:279-289.
28. von Bohl M, Kuijpers-Jagtman AM. Hyalinization during orthodontic tooth movement: a systematic review on tissue reactions. *Eur J Orthod* 2009;31:30-36.
29. Ashizawa Y, Sahara N. Quantitative evaluation of newly formed bone in the alveolar wall surrounding the root during the initial stage of experimental tooth movement in the rat. *Arch Oral Biol* 1998;43:473-484.
30. Kohno T, Matsumoto Y, Kanno Z, Warita H, Soma K. Experimental tooth movement under light orthodontic forces: rates of tooth movement and changes of the periodontium. *J Orthod* 2002;29:129-135.
31. Mori GG, Janjacom DM, Nunes DC, Castilho LR. Effect of zoledronic acid used in the root surface treatment of late replanted teeth: a study in rats. *Braz Dent J* 2010;21:452-457.

ARTIGO EM INGLÊS

TITLE PAGE

Effects of Zoledronic Acid on Orthodontic Tooth Movement in rats

Marcel Durante Brunet, DDS, MSD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil.

School of Health and Biosciences

Graduate Program in Dentistry – Orthodontics

Email: marcelbrunet@gmail.com

Odilon Guariza Filho, DDS, MSD, PhD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil.

School of Health and Biosciences

Graduate Program in Dentistry – Orthodontics

Email: odilongfilho@gmail.com

Aline Cristina Batista Rodrigues Johann, DDS, MSD, PhD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil.

School of Health and Biosciences

Graduate Program in Dentistry – Histopathology

Email: aline.johann@pucpr.br

Corresponding author

Odilon Guariza Filho, DDS, MSD, PhD

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil.

School of Health and Biosciences

Professor, Graduate Dentistry Program - Orthodontics

Rua Imaculada Conceição, 1155, Bairro Prado Velho, CEP 80215-901 – Curitiba, PR

Email: odilongfilho@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: The purpose of this study was to assess the effects of the administration of Zoledronic Acid (ZA) during orthodontic movement in rats.

Methods: Ninety male Wistar rats were applied force of 30 cN with spring closed nickel-titanium to move the upper right first molar to mesial. In the CM group, only tooth movement was performed; the CAZ group received a single dose (0.1mg/Kg) of ZA; the EAZ group received a single dose (0.1mg/Kg) one week prior to the start of tooth movement. The animals were euthanized after 3, 7 and 14 days. Tooth movement was measured using a caliper, the number of osteoclasts using TRAP staining, the expression of mature and immature collagen using picrosirius staining, and the presence of hyaline areas and root resorption using HE. The data were compared using two-way ANOVA, Tukey HSD, Games-Howell and Chi-squared test, at the 5% significance level. **Results:** A smaller number of osteoclasts, a trend toward decreasing tooth movement over time, and a greater percentage of hyaline area in the EAZ group. There was no difference among the groups regarding bone remodeling and root resorption for all observed times. **Conclusions:** ZA shows a tendency to inhibit tooth movement because it hinders bone resorption.

Key Words

Biphosphonates, Tooth Movement, Orthodontics, Wistar Rats.

INTRODUCTION

Biphosphonates, either oral or intravenous, are widely used in the treatment of certain metabolic bone diseases, such as Paget's Disease, osteogenesis imperfecta, fibrous dysplasia, Gaucher Disease, malignant hypercalcemia, osteopenia and osteoporosis.¹⁻³

These drugs can bind to hydroxyapatite crystals in a mineralized bone matrix and make the bone more resistant to osteoclasts. Linked to this, they inhibit the function and induce apoptosis of osteoclasts, thus inhibiting bone remodeling.^{1,3-5}

In addition to this, they not only restrict osteoclast activity, but also show osteoconductive and osteoinductive effects by increased osteoblastic activity.⁶⁻⁸

Zoledronic Acid (ZA) is a potent and innovative third generation biphosphonate containing nitrogen that is administered intravenously, with rapid absorption and concentration in the maxillary and mandibular structures. It is considered the most potent bone resorption inhibitor compared to other, currently available biphosphonates.^{4,9}

This drug shows great affinity for the calcium in bone and has an intraosseous half-life of approximately 10 years, making its effects on bone remodeling and repair possible for prolonged periods. Therefore, users can still be affected for many years, even after its use is discontinued.^{10,11}

Known complications of biphosphonate use are: decreased bone healing, and the ability to inhibit tooth movement. The inhibition of tooth movement can occur due to the reduction of osteoclastic activity, limiting bone remodeling and repair.¹⁰

The use of biphosphonates by adult patients has been more widespread; so, increasing our knowledge about biphosphonates is fundamental because these drugs have the potential to inhibit tooth movement.^{3,11}

Therefore, the aim of this study was to evaluate: a) bone resorption; b) the p of Type I and III collagen of the alveolar bone; c) the rate of tooth movement; d) the presence of hyaline areas; e) the presence of root resorption during orthodontic movement in rats subjected to the use of Zoledronic Acid.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the Ethics Committee for Animals (CEUA) of the Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Pontifical Catholic University of Paraná -PUCPR), opinion nº 628.

Sample Distribution

The sample comprised 90 male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), nine weeks old, weighing approximately 300-350 g, provided by the vivarium of the Pontifícia Universidade Católica of Paraná (PUCPR).

Following appropriate statistical calculations, the rats were divided into three groups as follows:

The CM group comprised 30 animals, in which no drug was administered and only tooth movement was performed using a force of 30 cN.^{14,15}

The CAZ group comprised 30 animals, in which Zoledronic Acid (Aclasta™, Novartis® Biociências, S.A.) was administered intraperitoneally in a single dose (0.1mg/Kg)^{1,16-18}, without application of tooth movement.

The EAZ group comprised 30 animals that were subjected to a 30 cN^{13,14} orthodontic force, in which Zoledronic Acid (Aclasta™, Novartis® Biociências, S.A.) was administered intraperitoneally in a single dose (0.1mg/Kg)^{1,16-18} one week prior to the start of tooth movement.

Each group was divided in the days 3, 7 and 14 days after initiation of tooth movement,^{17,18} with 10 animals each day.

Anaesthesia of the Animals and Preparation of the Orthodontic Device

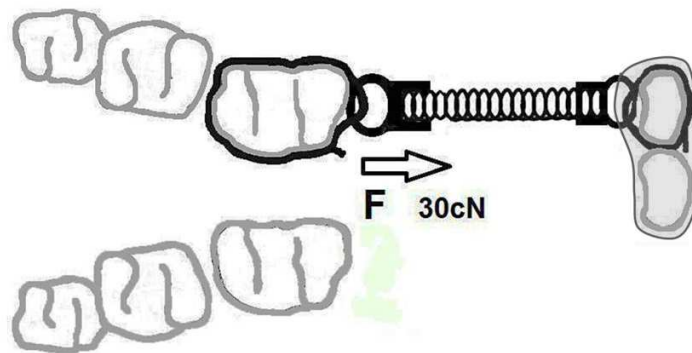
In order to install the orthodontic device, the animals were sedated with an intramuscular dose of 50 mg/kg of Tiletamina/Zolazepan (Zoletil 50®, Virbac Brasil Industry and Commerce Ltda, Jurubatuba, SP, Brasil).

The orthodontic device consisted of a *nickel titanium* closed spring (G&H® Wire Orthodontics, Franklin, IN) and a 0.25 mm thick stainless steel tying wire, used to secure the spring to the first right molar and the maxillary incisors of the animals.¹⁹

Installation and Activation of the Orthodontic Devices

The tying wire was analogous to a band encircling the crown of the first upper molar, while attaching to one end of the spring. The other end was attached to the upper incisor on the same side, using a tying wire and composite resin (Charisma[®], Heraeus Kulzer, Hanau, Germany) (Figura 1). The measurement of force (30cN) produced by the spring was standardized using a tensiometer (Haag-Streit AG, Koeniz, Switzerland).

Fig. 1 Schematic of the installed orthodontic device



Measurement of the Rate Tooth Movement

The rate of tooth movement was measured using a digital caliper (Absolute-Mitutoyo, Kawasaki-Shi, Japan) prior to installation of the spring and immediately after the euthanizing of the animals, in all times observed (3, 7 and 14 days). The distance between the palatal surface of the upper right incisor and mesial surface of the first upper right molar was measured.¹²

Histotechnical Processing and Histological Analysis

After 3, 7 and 14 days from the installation of the spring, the animals were euthanized using an overdose of the anesthetic solution.¹⁵

Following euthanasia, the maxilla of each animal was removed, dissected and sectioned along the midline. The right hemi-maxilla was fixed in 10% formalin for 24 hours and demineralized with 5% EDTA for two months.

Following complete demineralization, the specimens were processed and embedded in the Experimental Pathology Laboratory of PUCPR. Five cross-sections were obtained from the cervical third of the mesio-buccal root of the first molar, cut into microsections of 4 μm thickness with an interval of 60 μm between each section. These sections were stained using hematoxylin and Picrosirius Red eosin, and using the histochemical Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP) technique.²⁰ The TRAP enzyme is considered a timely marker of osteoclasts, and may be used to quantitatively determine bone resorption.²¹ The TRAP staining was performed using the TRAP 387 kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), according to manufacturer's instructions. In each section, five images were captured of the mesial region of the mesio-buccal root of the first molar, comprising a total area of 942.813,00 μm^2 , using an Olympus BX-50 (Olympus, Tokyo, Japan) microscope attached to a Dinolite AM 423X (AmMo Eletronics Corporation, New Taipei City, Taiwan) microcamera with 400X magnification.²⁰ The image acquisition parameters were set during the capture process. The count of the number of osteoclasts was done using the morphometric program Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), in which a counting grid was created. Multinucleated, TRAP-positive cells, located next to bone tissue, were considered to be osteoclasts. To obtain the number of osteoclasts, the osteoclasts of the five images were first totaled and then the mean of the five sections was calculated.²⁰ (Figure 2)

The presence or absence of hyaline areas and bone resorption were identified using slides stained with Hematoxylin and Eosin (Figure 4), using an Olympus BX-50 (Olympus, Tokyo, Japan) optical microscope attached to a Dinolite® AM 423X (AmMo Electronics Corporation, New Taipei City, Taiwan) microcamera.

The organic matrix of new bone formation on the tension side was verified in slides stained using Picrosirius. An area on the distal side of the referenced root of each section was selected and an image was captured using the Olympus BX-50 (Olympus, Tokyo, Japan) optical microscope attached to the Dinolite® AM 423X (AmMo Electronics Corporation, New Taipei City, Taiwan) microcamera and a polarizing lens (Olympus UP-110) with 100X magnification.^{12,13} The images were

edited using the Adobe Photoshop® CS6® (Adobe Systems Incorporated, USA) program in which the periodontal ligament and tooth were deleted, selecting only bone tissue. The automatic analysis system, Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silvers Springs, MD, USA), was used to measure the percentage of mature and immature collagen areas.^{13,22} The percentage of each type of collagen for each animal was obtained from the mean of the five sections.

Against the black background, the thick, organized and strongly adhered fibers represent the mature collagen (Type I), with red staining. The finer, disorganized and loose fibers correspond to the immature collagen (Type III), giving it a greenish color.^{12,13,22} (Figure 3)

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS 19.0 (SPSS, Chicago, IL) program, in order to compare whether there was difference in the mean values of the variables: Type I collagen in the bone, Type III collagen in the bone, measurement of tooth movement and number of osteoclasts according to group and time. The normality of the data was tested using the Kolmogorov-Smirnov test, and the homogeneity of variance using the Levene test. It was found that only one treatment did not show normal distribution ($p < 0.05$). Comparison of mean values between group, time and the group X time interaction was performed using two-way ANOVA, full factorial model. When ANOVA indicated difference between any one of the two factors, and the Levene test indicated homogeneous variances, the treatments were compared 2 by 2 using the parametric Tukey HSD multiple comparisons test for homogeneous variances. Otherwise, the parametric Games-Howell multiple comparisons test for heterogeneous variance was used. The 5% ($p < 0.05$) significance level was adopted

In order to evaluate if dependence existed between the presence or absence of hyaline area and root resorption according to group, time, and the interaction of group X time, the Chi-squared test was used at the 5% ($p < 0.05$) significance level.

RESULTS

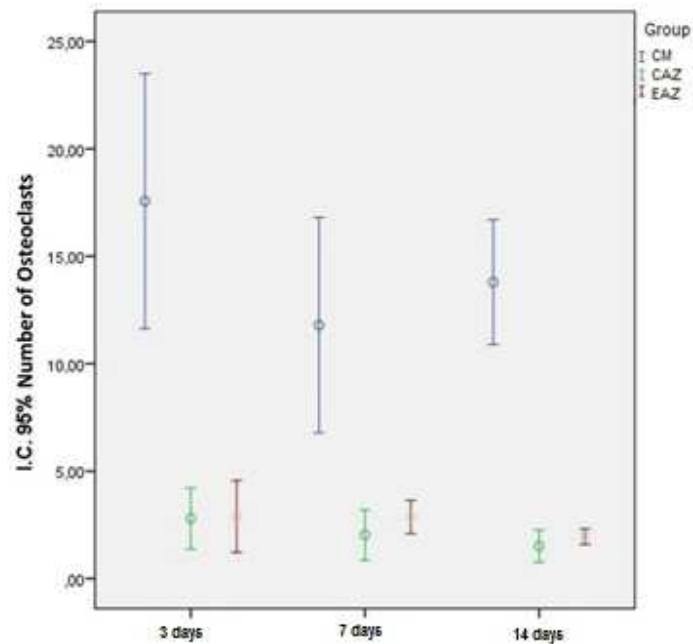
Bone Resorption

Using the Games-Howell multiple comparisons test for the group x time variable, it was observed that the CM Group showed statistically significant difference ($p < 0.05$) compared to the CAZ and EAZ groups at all times of observation (3, 7 and 14 days). The CM Group showed a higher number of osteoclasts than did the other groups in which ZA was administered, indicating that the amount of bone resorption was greater in the group without the drug. (Graph I, Table I, Figure 2).

Table I. Mean, Standard Deviation and p Value of the variables: number of osteoclasts, percentage of Type I collagen, percentage of Type III collagen and rate of tooth movement in the movement control group (CM), the Zoledronic Acid (CAZ) control group, and the experimental (EAZ) group on days 3, 7 and 14.

Variables	Average $\pm$ DP			P Value		
	CM	CAZ	EAZ	CM x CAZ	CM x EAZ	CAZ x EAZ
Osteoclasts						
3	17,56 $\pm$ 7,71	2,79 $\pm$ 1,98	2,89 $\pm$ 2,00	0,0062	0,0443	1,0000
7	11,79 $\pm$ 7,00	1,98 $\pm$ 1,64	2,87 $\pm$ 1,09	0,0269	0,0453	0,9042
14	13,79 $\pm$ 4,05	1,51 $\pm$ 0,98	1,96 $\pm$ 0,50	0,0001	0,0001	0,9345
Type I Collagen						
3	78,00 $\pm$ 11,71	78,23 $\pm$ 16,78	80,68 $\pm$ 16,69	0,0964	0,2545	0,2498
7	78,21 $\pm$ 12,35	80,84 $\pm$ 19,96	83,12 $\pm$ 10,32	0,1990	0,1353	0,2000
14	80,47 $\pm$ 8,97	87,35 $\pm$ 5,28	82,66 $\pm$ 12,89	0,2234	0,1926	0,1923
Type III Collagen						
3	22,00 $\pm$ 11,71	21,77 $\pm$ 16,78	19,32 $\pm$ 16,69	0,0964	0,2545	0,2498
7	21,79 $\pm$ 12,35	19,16 $\pm$ 19,96	16,88 $\pm$ 10,32	0,1990	0,1353	0,2000
14	19,53 $\pm$ 8,97	12,65 $\pm$ 5,28	17,34 $\pm$ 12,89	0,2234	0,1926	0,1923
Dental Movement						
3	4,17 $\pm$ 3,65	2,25 $\pm$ 2,29	8,22 $\pm$ 4,92	0,8724	0,5123	0,0696
7	5,56 $\pm$ 4,37	1,24 $\pm$ 0,91	6,94 $\pm$ 4,33	0,1595	0,9979	0,0376
14	9,56 $\pm$ 6,05	1,66 $\pm$ 1,60	6,92 $\pm$ 2,72	0,0402	0,9263	0,0024

Games-Howell Test with a 5% level of significance.



Graph I. Comparison between groups x time of the number of osteoclasts variable.

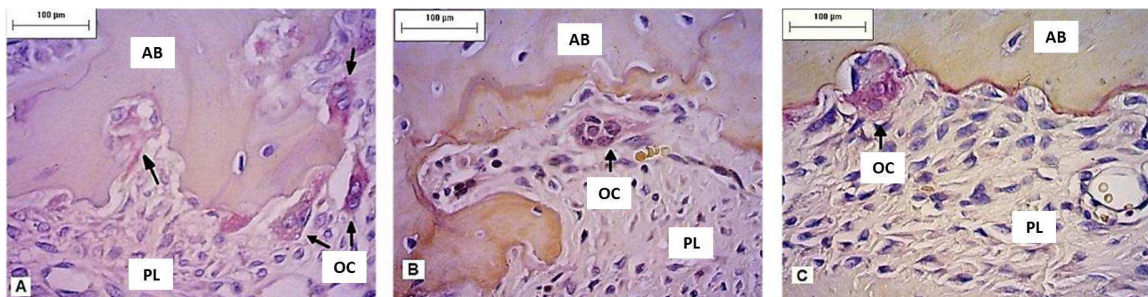


Fig. 2 14 day time, a greater number of osteoclasts (TRAP-positive cells – black arrows) was observed in the CM Group (A) when compared to the CAZ (B) and EAZ (C) groups. AB, alveolar bone; PL, periodontal ligament; OC osteoclasts (TRAP staining, 400X magnification).

New Bone Formation

The percentage of Type I and Type III collagen in the bone was assessed using the Games-Howell multiple comparisons test, and no statistically significant difference was found ($p > 0.05$) between the groups at any observation times (3, 7 and 14 days). (Table I and Figure 3)

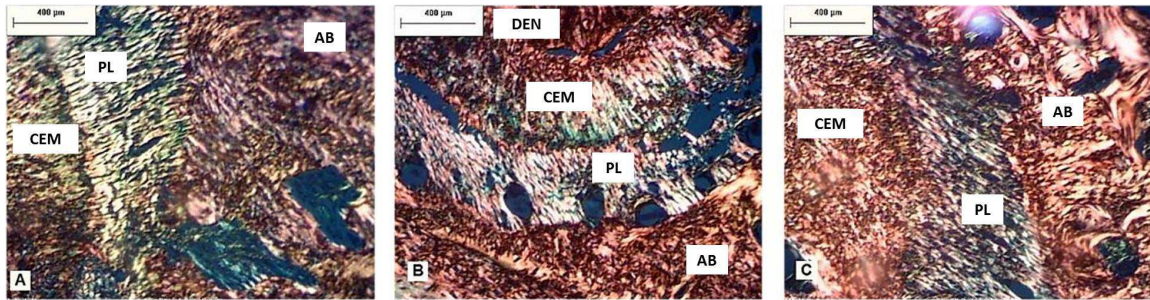
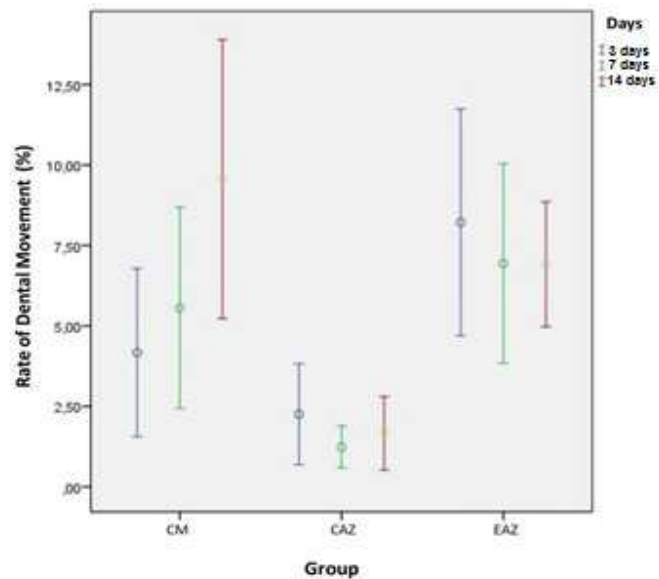


Fig. 3 14 day time, no difference in staining of bone collagen was observed in the CM (A), CAZ (B), and EAZ (C) groups, at any observation times. AB, alveolar bone; PL, periodontal ligament; DEN, dentin; CEM, cementum (Picrosirius staining, magnification 100X)

Rate of Tooth Movement

No statistically significant difference was observed ($p>0.05$) between the CM and EAZ groups (those subjected to the orthodontic device) during the three observation times (3, 7 and 14 days), when the Games-Howell multiple comparisons test was used. (Table I)

However, a trend toward gradual increase in the rate of tooth movement was observed in the CM group at all times of observation. On the other hand, a trend toward gradual decrease in the rate of tooth movement was observed in the EAZ group at times of 3, 7 and 14 days. (Graph II)



Graph II. Rate of Dental Movement according to group and time

Hyaline Areas

At the 7 day time, it is noted that the EAZ group shows a greater presence of hyaline areas (90%) than the CM group (10%).

However, at the times of 3 and 14 days, no statistically significant difference ($p>0.05$) was observed (Table II).

Table II. Percentage and P value of the presence of variables: hyaline area and root resorption in the movement control group (CM), the Zoledronic Acid control group (CAZ) and the experimental group (EAZ) at 3, 7 and 14 days.

Variables	Days	Percentage (%)			P Value		
		CM	CAZ	EAZ	CM x CAZ	CM x EAZ	CAZ x EAZ
Hyaline Area	3	33	0	75	0,0322	0,0519	0,0020
	7	10	0	90	0,1592	0,0011	0,0004
	14	60	0	50	0,0060	0,3292	0,0122
Root Resorption	3	0	40	25	0,0238	0,0656	0,2560
	7	40	30	70	0,3224	0,0971	0,0462
	14	80	67	60	0,2642	0,1710	0,3779

Chi-SquareTest with a significance level of 5%

Root Resorption

No statistically significant difference ($p>0.05$) was observed between the CM and the EAZ groups at all times of evaluation (Table II).

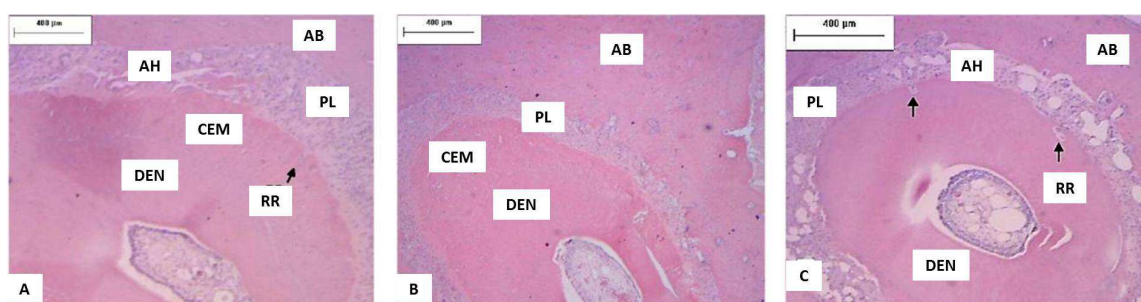


Fig. 4 At the 14 day time, hyaline areas and root resorption in groups: CM (A), CAZ (B), and EAZ (C). AH, hyaline area; RR, root resorption; OA, alveolar bone; LP, periodontal ligament; DEN, dentin; CEM, cementum (Hematoxylin and eosin staining, 100X magnification)

DISCUSSION

Bisphosphonates inhibit osteoclastic activity and microcirculation, and may inhibit tooth movement.^{3,8,20} Zoledronic Acid was used In this study, as it is a novel Bisphosphonate and its relation to dental movement is still little studied.²³

Zoledronic Acid is administered to humans in a single dose, repeated annually according to the needs of each patient. It is characterized by rapid absorption and concentration in the maxillary and mandibular structures, and may stay in the body for up to 10 years. With the aim of assessing the effects of Zoledronic Acid on periodontal structures over time, the drug was administered one week prior to the installation of the orthodontic device, in the same way as done in other studies.^{1,14-16}

A smaller number of osteoclasts was observed in the CAZ and EAZ groups in relation to the CM group, at all times observed, showing no variation over time. (Table I) This result represents a decrease in osteoclastic activity, consequently decreasing bone remodeling, and is similar to previous studies by Ozturk et al¹ and Huja et al⁴, using Zoledronic Acid in rats and dogs, respectively.^{1,4}

Interpretation of the results of this study makes it possible to suggest that the drug was effective, since its purpose is to inhibit the function and induce the apoptosis of osteoclasts.^{1,3,-5}

Studies show that, following application of orthodontic force, cells and collagen fibers are compressed and stretched on the compression and tension sides, respectively. The biological process proceeds with the recruitment of osteoclasts and osteoblasts, and with alveolar bone remodeling.^{18,20,24}

This study also sought to evaluate structural changes in the trabecular bone matrix, newly formed in the simultaneous presence of tooth movement and Zoledronic Acid, by the Picrosirius method using polarized light. This enabled the detection of mature and immature collagen fibers, and to correlate the three-dimensional distribution of collagen fibers with the stage of bone formation (Figure 3).²⁵

The organic matrix of alveolar bone consists mainly of Type I collagen (95% of the organic matrix). The formation of new bone results from complex and

interdependent events that involve since the differentiation of osteoblasts from primitive mesenchymal cells, synthesis of the organic matrix, its maturation, until complete mineralization.¹⁷

The results found in this study show that the groups subjected to the use of Zoledronic Acid presented no statistically significant difference from the group that did not use the drug ($p>0.05$), at any observed times (Table I), regarding the percentage of Type I and Type III collagen in the alveolar bone. Therefore, the Zoledronic Acid did not interfere with the process of new bone formation

Kubek et al²⁶ in their study with rats that were subjected to the use of Zoledronic Acid, noticed that the treatment significantly suppressed medullary remodeling in the maxillary bones.²⁶

Taking into consideration that Zoledronic Acid is largely absorbed in maxillary bone structures^{4,9}. The results found in this study differed from those of Kubek et al.²⁶, possibly because these authors applied the drug in two doses intravenously, thus enabling the maxillary bone structures, which are highly irrigated, to have greater concentrations of the drug. Moreover, the animals of that study were female and ovariectomized; in this situation, they present behavior similar to women in the postmenopausal phase, during which phase they are more prone to osteoporosis, showing greater bone remodeling.²⁶

Patients undergoing orthodontic treatment using bisphosphonates show reduction in tooth movement.^{3,5,19} Knowing the possibility of reduction in tooth movement, this study aimed to assess the rate of tooth movement. However, the results showed no statistically significant difference ($p>0.05$) between any groups during the times evaluated. However, Graph II shows a tendency to decrease the amount of tooth movement over time in the EAZ group when compared to the CM Group.

Choi et al¹⁹, observed a reduction in the amount of tooth movement in male and female rats when bisphosphonate Clodronate was used.¹⁹

Tooth movement has been higher in ovariectomized rats, since they display behavior similar to that of women with osteoporosis, a disease in which the bone becomes more porous facilitating tooth movement in the periodontium.

Sirinsoontorn et al⁵, in their study, found reduced tooth movement in these animals.⁵

Despite no statistically significant difference being found in this study, the tendency toward reduced tooth movement that was found showed that the results of previous research must be considered cautiously.

The force applied to the tooth during tooth movement compresses the vessels of the periodontal ligament, generates hypoxia and, consequently, leakage and/or cell death. The extracellular matrix alters the biochemistry and organizational relationship of the components, resulting in areas of greater protein concentration with a union of dense bundles of collagen fibers. This results in areas microscopically poor in cells and with a homogeneous eosinophilic aspect, called the hyaline areas of the extracellular matrix.²⁹

According to Table II, the EAZ group showed a greater percentage of hyaline areas (90%) when compared to the CM group (10%) at the 7 day time; but, at other times, no statistically significant difference was observed.

This difference in the presence of hyaline areas at the time of 7 days occurred along with a reduction in the amount of hyaline areas in BC and increasing the presence of hyaline areas EAZ group, which may indicate that at the stage of bone healing in areas that tend hyaline to reduce animal without the use of the drug zoledronic acid interfered in the presence of hyaline areas increasing their presence.

Root resorption is a well-known, adverse effect of orthodontic treatment.³⁰ In assessing the conditions of the tooth and periodontium of the rats subjected to orthodontic movement, the presence of areas of root resorption is reported.^{30,31}

In the present study, the animals from the CM and EAZ groups showed no statistically significant difference in the amount of root resorption ($p>0.05$) in any of the times observed. This does not indicate that use of the drug has caused alterations in the presence of root resorption.

Contrary to the results of this study, the literature reports that under the effect of bisphosphonates, mice that underwent tooth movement showed less root resorption.^{5,30} Mori et. al.³⁰ observed reduced root resorption in rats where

Zoledronic Acid was applied actively on the root surface of re-implanted teeth, and not in a systemic, intraperitoneal way as in this study.³²

In another study, Sirisoontorn et al⁵ reported that ovariectomized rats, subjected to tooth movement and under the effect of Zoledronic Acid, showed reduced root resorption in relation to rats not subjected to the drug.⁵ The difference in findings may have occurred because Sirisoontorn et al⁵ compared the amount of resorption between ovariectomized rats with and without the effect of Zoledronic Acid. Ovariectomized rats have a greater propensity to produce root resorption than non-ovariectomized rats, thus it can be suggested that the drug did not influence, and the amount of root resorption was already higher only remained.⁵

Due to the large demand by adults for orthodontic treatment, and to the use of Zoledronic Acid being more widespread among these patients, the orthodontist must inform patients about the possible adverse effects of treatment and the possibility of a longer treatment time because a longer interval between the activations of the apparatus is recommended for these patients considering the influence of the drug on bone resorption.³ Thus, it should be recommended that the case history contain questions about medications used by the patients, keeping in mind that they may influence tooth movement, even many years after discontinuing their use.

CONCLUSIONS

- a) The animals showed fewer osteoclasts and, consequently, less bone remodeling under the effect of Zoledronic Acid and tooth movement.
- b) The alveolar bone showed no alterations in remodeling when Zoledronic Acid was used.
- c) When under the effect of Zoledronic Acid, the amount of tooth movement tended to decrease over some days.
- d) A greater percentage of hyaline areas was observed when under the effect of orthodontic force and Zoledronic Acid at the 7 day time.
- e) The amount of root resorption is similar in animals with the use of Zoledronic Acid when compared to the animals without the use of the drug.

REFERENCES

1. Ozturk F, Babacan H, Gumus C. Effects of zoledronic acid on sutural bone formation: a computed tomography study. *Eur J Orthod* 2012;34:141-146.
2. Matos MA, Araujo FP, Paixao FB. The effect of zoledronate on bone remodeling during the healing process. *Acta Cir Bras* 2007;22:115-119.
3. Rinchuse DJ, Sosovicka MF, Robison JM, Pendleton R. Orthodontic treatment of patients using bisphosphonates: a report of 2 cases. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007;131:321-326.
4. Huja SS, Kaya B, Mo X, D'Atri AM, Fernandez SA. Effect of zoledronic acid on bone healing subsequent to mini-implant insertion. *Angle Orthod* 2011;81:363-369.
5. Sirisoontorn I, Hotokezaka H, Hashimoto M, Gonzales C, Luppapornlarp S, Darendeliler MA et al. Orthodontic tooth movement and root resorption in ovariectomized rats treated by systemic administration of zoledronic acid. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012;141:563-573.
6. Altundal H, Gursoy B. The influence of alendronate on bone formation after autogenous free bone grafting in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:285-291.
7. Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials* 2004;25:4105-4115.
8. Pampu AA, Dolanmaz D, Tuz HH, Avunduk MC, Kisnisci RS. Histomorphometric evaluation of the effects of zoledronic acid on mandibular distraction osteogenesis in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66:905-910.
9. Cheer SM, Noble S. Zoledronic acid. *Drugs* 2001;61:799-805; discussion 806.
10. Kimmel DB. Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Dent Res* 2007;86:1022-1033.
11. Zahrowski JJ. Bisphosphonate treatment: an orthodontic concern calling for a proactive approach. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007;131:311-320.
12. Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. The rat as a model for orthodontic tooth movement--a critical review and a proposed solution. *Eur J Orthod* 2004;26:483-490.
13. Luégua Amorim Henriques Knop RLS, Luciana Borges Retamoso, Jucienne Salgado Ribeiro and Orlando Motohiro Tanaka. Non-steroidal and steroidal anti-inflammatory use in the context of orthodontic movement. *The European Journal of Orthodontics* 2011.
14. Little DG, Peat RA, McEvoy A, Williams PR, Smith EJ, Baldock PA. Zoledronic acid treatment results in retention of femoral head structure after traumatic osteonecrosis in young Wistar rats. *J Bone Miner Res* 2003;18:2016-2022.
15. Amanat N, McDonald M, Godfrey C, Bilston L, Little D. Optimal timing of a single dose of zoledronic acid to increase strength in rat fracture repair. *J Bone Miner Res* 2007;22:867-876.
16. Pereira FRA, Dutra, R.C. Effects of zoledronic acid on ooforectomized rats tibia: a prospective and randomized study. *Rev Bras Ortopedia* 2009;44:61-68.

17. Retamoso L, Knop L, Shintcovsk R, Maciel JV, Machado MA, Tanaka O. Influence of anti-inflammatory administration in collagen maturation process during orthodontic tooth movement. *Microsc Res Tech* 2011;74:709-713.
18. 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;40:827-830.
19. Choi J, Baek SH, Lee JI, Chang YI. Effects of clodronate on early alveolar bone remodeling and root resorption related to orthodontic forces: a histomorphometric analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;138:548 e541-548; discussion 548-549.
20. Braga SM, Taddei SR, Andrade I, Jr., Queiroz-Junior CM, Garlet GP, Repeke CE et al. Effect of diabetes on orthodontic tooth movement in a mouse model. *Eur J Oral Sci* 2011;119:7-14.
21. Galvao MJ, Santos A, Ribeiro MD, Ferreira A, Nolasco F. Optimization of the tartrate-resistant acid phosphatase detection by histochemical method. *Eur J Histochem* 2011;55:e1.
22. Marquezan M, Bolognese AM, Araujo MT. Effects of two low-intensity laser therapy protocols on experimental tooth movement. *Photomed Laser Surg* 2010;28:757-762.
23. Graham JW. Bisphosphonates and orthodontics: Clinical implications. *J Clin Orthod* 2006;40:425-428; quiz 419.
24. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129:469 e461-432.
25. Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Hofling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochem Photobiol B* 2003;70:81-89.
26. Kubek DJ, Burr DB, Allen MR. Ovariectomy stimulates and bisphosphonates inhibit intracortical remodeling in the mouse mandible. *Orthod Craniofac Res* 2010;13:214-222.
27. von Bohl M, Kuijpers-Jagtman AM. Hyalinization during orthodontic tooth movement: a systematic review on tissue reactions. *Eur J Orthod* 2009;31:30-36.
28. Ashizawa Y, Sahara N. Quantitative evaluation of newly formed bone in the alveolar wall surrounding the root during the initial stage of experimental tooth movement in the rat. *Arch Oral Biol* 1998;43:473-484.
29. Kohno T, Matsumoto Y, Kanno Z, Warita H, Soma K. Experimental tooth movement under light orthodontic forces: rates of tooth movement and changes of the periodontium. *J Orthod* 2002;29:129-135.
30. Mori GG, Janjacom DM, Nunes DC, Castilho LR. Effect of zoledronic acid used in the root surface treatment of late replanted teeth: a study in rats. *Braz Dent J* 2010;21:452-457.

ANEXOS

ANEXO I - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA PUCPR



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 29 de setembro de 2011.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 628 – 2ª Versão

TÍTULO DO PROJETO: Efeitos do ácido zoledrônico na movimentação ortodôntica induzida em ratos

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Marcel Durante Brunet

EQUIPE DE PESQUISA:

Marcel Durante Brunet, Odilon Guariza Filho

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CENTRO / CURSO:

CCBS / Mestrado em ortodontia

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Ratos (<i>Ratus norvegicus</i>)	Machos	300-350g	B	90

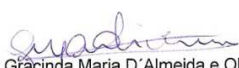
O colegiado do CEUA em reunião no dia 29/09/2011, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

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

Atenciosamente,


Profª Gracinda Maria D'Almeida e Oliveira
Coordenadora Adjunta
Comitê de Ética no Uso de Animais

ANEXO II – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO – AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS

Information for Authors

Electronic manuscript submission and review

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

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

Send other correspondence to:

Dr. Vincent G. Kokich, DDS, MSD, Editor-in-Chief

American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics

University of Washington

Department of Orthodontics, D-569

HSC Box 357446

Seattle, WA 98195-7446

Telephone (206) 221-5413

E-mail: vgkokich@u.washington.edu

General Information

The American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics publishes original research, reviews, case reports, clinical material, and other material related to orthodontics and dentofacial orthopedics. Submitted manuscripts must be original, written in English, and not published or under consideration elsewhere. Manuscripts will be reviewed by the editor and consultants and are subject to editorial revision. Authors should follow the guidelines below. Statements and opinions expressed in the articles and communications herein are those of the author(s) and not necessarily those of the editor(s) or publisher, and the editor(s) and publisher disclaim any responsibility or liability for such material. Neither the editor(s) nor the publisher guarantees, warrants, or endorses any product or service advertised in this publication; neither do they guarantee any claim made by

themanufacturer of any product or service. Each reader must determine whether to act on the information in this publication, and neither the Journal nor its sponsoring organizations shall be liable for any injury due to the publication of erroneous information.

Guidelines for Original Articles

Submit Original Articles via EES: ees.elsevier.com/ajodo.

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

1. *Title Page.* Put all information pertaining to the authors in a separate document. Include the title of the article, full name(s) of the author(s), academic degrees, and institutional affiliations and positions; identify the corresponding author and include an address, telephone and fax numbers, and an e-mail address. This information will not be available to the reviewers.

2. *Abstract.* Structured abstracts of 200 words or less are preferred. A structured abstract contains the following sections: Introduction, describing the problem; Methods, describing how the study was performed; Results, describing the primary results; and Conclusions, reporting what the authors conclude from the findings and any clinical implications.

3. *Manuscript.* The manuscript proper should be organized in the following sections: Introduction and literature review, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, and figure captions. Express measurements in metric units, whenever practical. Refer to teeth by their full name or their FDI tooth number. For style questions, refer to the AMA Manual of Style, 9th edition. Cite references selectively, and number them in the order cited. Make sure that all references have been mentioned in the text. Follow the format for references in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997;126:36-47); ➔ <http://www.icmje.org> . Include the list of references with the manuscript proper. Submit figures and tables separately (see below); do not embed figures in the word processing document.

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

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

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

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

"The undersigned author(s) transfers all copyright ownership of the manuscript **[insert title of article here]** to the American Association of Orthodontists in the event the work is published. The undersigned author(s) warrants that the article is original, does not infringe upon any copyright or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, has not been previously published, and includes any product that may derive from

the published journal, whether print or electronic media. I (we) sign for and accept responsibility for releasing this material." Scan the printed [copyright release](#) and submit it via EES.

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

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

10. Systematic Reviews and Meta-Analyses must be accompanied by the current PRISMA checklist and flow diagram (go to [Video on CONSORT and PRISMA](#)). For complete instructions, see our [Guidelines for Systematic Reviews and Meta-Analyses](#).

11. Randomized Clinical Trials must be accompanied by the current CONSORT statement, checklist, and flow diagram (go to [Video on CONSORT and PRISMA](#)). For complete instructions, see our [Guidelines for Randomized Clinical Trials](#).

Other Articles

Follow the guidelines above, with the following exceptions, and submit via EES. Case Reports will be evaluated for completeness and quality of records, quality of treatment, uniqueness of the case, and quality of the manuscript. A high quality manuscript must include the following sections: introduction; diagnosis; etiology; treatment objectives, treatment alternatives, treatment progress, and treatment results; and discussion. The submitted figures must include extraoral and intraoral photographs and dental casts, panoramic radiographs, cephalometric radiographs, and tracings from both pretreatment and posttreatment, and progress

or retention figures as appropriate. Complete Case Report Guidelines can be downloaded from [Case Report Guidelines](#).

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

Miscellaneous Submissions

Letters to the Editor and their responses appear in the Readers' Forum section and are encouraged to stimulate healthy discourse between authors and our readers. Letters to the Editor must refer to an article that was published within the previous six (6) months and must be less than 500 words including references. Send letters or questions directly to the editor, via e-mail: vgkokich@u.washington.edu. Submit a signed copyright release with the letter.

Brief, substantiated commentary on subjects of interest to the orthodontic profession is published occasionally as a Special Article. Submit Guest Editorials and Special Articles via the Web site. Books and monographs (domestic and foreign) will be reviewed, depending upon their interest and value to subscribers. Send books to the Editor in Chief, Dr. Vincent G. Kokich, Department of Orthodontics, University of Washington D-569, HSC Box 357446, Seattle, WA 98195-7446. They will not be returned.

Checklist for authors

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

- Abstract
- Article proper, including references and figure legends
- Figures, in TIF or EPS format
- Tables
- [Copyright release statement](#), signed by all authors
- [Photographic consent statement\(s\)](#)
- [ICMJE Conflict of interest statement](#)
- Permissions to reproduce previously published material