



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Cristiane Canavarro Rodrigues Martins

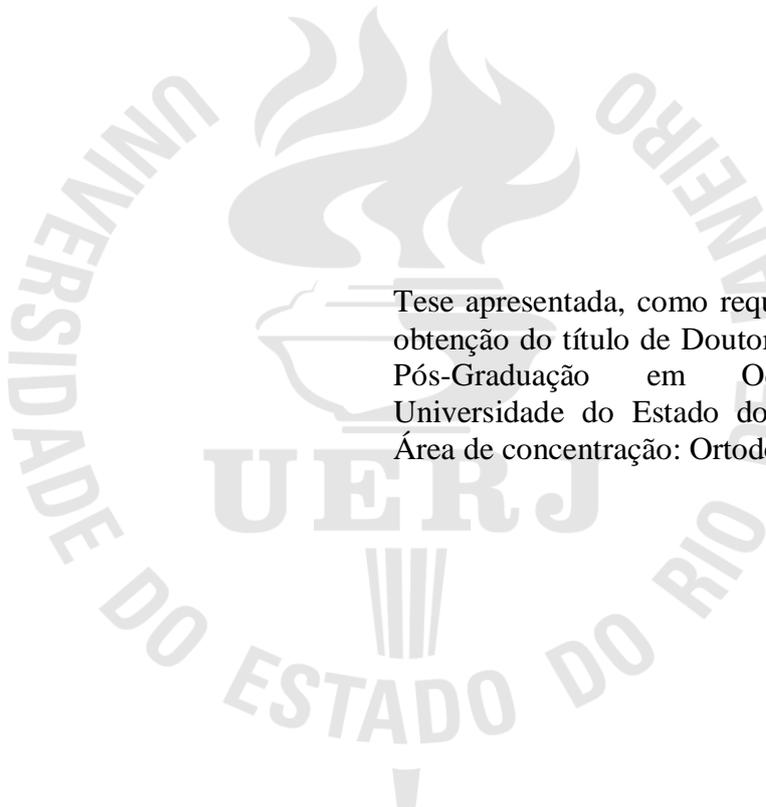
**Avaliação dos níveis de metaloproteinases da matriz no fluido gengival
durante a movimentação dentária ortodôntica**

Rio de Janeiro

2010

Cristiane Canavarro Rodrigues Martins

Avaliação dos níveis de metaloproteinases da matriz no fluido gengival durante a movimentação dentária ortodôntica



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Área de concentração: Ortodontia.

Orientadores: Prof. Dr. Jonas Capelli Júnior

Prof. Dr. Ricardo Palmier Teles

Rio de Janeiro

2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

M386 Martins, Cristiane Canavarro Rodrigues.
Avaliação dos níveis de metaloproteinases da matriz no fluido gengival durante a movimentação dentária ortodôntica / Cristiane Canavarro Rodrigues Martins. – 2010.
68 f.

Orientadores: Jonas Capelli Júnior e Ricardo Palmier Teles.
Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.

1. Metaloproteinases da matriz. 2. Periodonto. 3. Fluido do sulco gengival. 4. Movimentação dentária. 5. Ortodontia. I. Capelli Júnior, Jonas. II. Teles, Ricardo Palmier. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

CDU
616.314

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

Assinatura

Data

Cristiane Canavarro Rodrigues Martins

Avaliação dos níveis de metaloproteinases da matriz no fluido gengival durante a movimentação dentária ortodôntica

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Ortodontia.

Aprovada em 30 de março de 2010.

Orientadores:

Prof. Dr. Jonas Capelli Júnior
Faculdade de Odontologia da UERJ

Prof. Dr. Ricardo Palmier Teles
Departamento de Periodontia, Forsyth Institute

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Marcelo da Silva Figueredo
Faculdade de Odontologia da UERJ

Prof. Dr. José Nelson Mucha
Faculdade de Odontologia da UFF

Prof. Dr. Marco Antonio de Oliveira Almeida
Faculdade de Odontologia da UERJ

Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior
Faculdade de Ciências Médicas da UERJ

Prof. Dr. Robert Willer Farinazzo Vitral
Faculdade de Odontologia da UFJF

Rio de Janeiro

2010

DEDICATÓRIA

Ao Bruno, meu grande companheiro nesta batalha, por fazer meus dias muito mais felizes.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Martins e Ulysséa, pelo total apoio em minha vida, por terem sempre segurado a minha mão e mostrado o melhor caminho a trilhar, acreditando em mim mais do que qualquer pessoa.

Aos meus irmãos, Marcela e Lucas pelo carinho, pelo amor e pela simples e grande presença em minha vida, que faz de mim uma pessoa muito mais feliz.

Ao meu marido Bruno, grande incentivador dos meus passos, pela compreensão, pelo companheirismo, pelo amor e pela presença e ajuda constantes em minha vida.

Ao meu padrinho Frederico Canavarro, por quem tenho profunda admiração, por todo incentivo, carinho e estímulo dados durante a minha formação acadêmica e profissional.

Ao professor Jonas Capelli Júnior por sua orientação cuidadosa e detalhista, pelo carinho e atenção em todos os momentos, pela capacidade de estímulo que só os grandes mestres possuem. Obrigada pelo apoio e pela amizade que muito contribuíram para meu amadurecimento profissional e pessoal. Faltam-me palavras para agradecer tamanha dedicação.

Ao professor e orientador Ricardo Palmier Teles e à querida Flávia Teles que tornaram possível a realização deste estudo ao me receberem no *Forsyth Institute*. Agradeço pelo carinho, ajuda e pela orientação segura que foram de fundamental importância para conclusão deste trabalho.

Ao nosso grande chefe Antonio Carlos Peixoto da Silva por ter alcançado a sabedoria mais imponente de todas: aquela que sabe se aliar à humildade. Um exemplo a ser seguido.

Ao professor Marco Antonio de Oliveira Almeida, sempre incansável, pela disponibilidade sempre presente, com uma resposta para todas as dúvidas, incentivando o crescimento e amadurecimento necessários para a boa formação de cada aluno.

Ao professor José Augusto Mendes Miguel pela dedicação à minha formação científica e pessoal, pelo carinho de sempre e, principalmente, pela amizade e pela descontração, proporcionando momentos de agradável convivência.

Aos demais queridos professores do curso de Pós-Graduação em Ortodontia da Faculdade de Odontologia da UERJ, Alvaro de Moraes Mendes, Álvaro Francisco Carriello Fernandes, Cátia Cardoso Abdo Quintão, Flavia Gebara Artese, Ione Helena Portella Brunharo, Maria das Graças Carlini, Maria Teresa de Andrade Goldner e Vera Lúcia Cosendey pela grande dedicação e participação em minha vida profissional.

À amiga Stephanie Drummond por ter compartilhado momentos importantes para a realização deste trabalho. Sua colaboração, organização, solicitude e amizade durante a execução da parte experimental deste trabalho foram essenciais, muito obrigada.

Aos alunos de especialização que com grande competência auxiliaram na condução clínica dos casos estudados neste trabalho, apresentando-se sempre disponíveis e solícitos: Clarissa Kantz, Eveline Gava, Juliana de Paiva, Lívia Saladini, Marcos Hiroce e Renato Rédua.

Ao Rivail Fidel Jr. pelo acompanhamento periodontal dos pacientes durante o estudo.

Aos amigos Rhita Almeida e Felipe Carvalho pela amizade, pela disponibilidade e por dividirem momentos de muita alegria no dia-a-dia.

Ao David Normando por compartilhar seus vastos conhecimentos de maneira clara e objetiva. É uma grande honra tê-lo como colega de turma de Doutorado.

Às minhas queridas amigas de turma de Mestrado, Andressa Otranto, Lisiane Palagi, Maria Fernanda Nova, Mariana Martins e Vera Lúcia Cosendey por terem compartilhado momentos importantes de convivência, construindo e solidificando nossa amizade.

Às minhas grandes amigas e eternas companheiras de turma de especialização em Ortodontia da UERJ, com as quais vivi grandes momentos da minha vida: Adriana Alves, Aline Cabral, Lisiane Palagi, Luciane Suzigan e Soraia Macari. Vocês acrescentaram muito à minha vida e deixam muitas saudades.

Aos colegas das outras turmas de especialização, de mestrado e de doutorado pelos auxílios e incentivos que tornam este curso mais grandioso.

Às funcionárias Mônica Marques, Fernanda Galvão, Fernanda Tavares, Dayane Gonçalves e Deíris de Andrade pela dedicação e auxílio imprescindíveis que permitiram o funcionamento harmonioso deste curso.

Aos funcionários da secretaria de Pós-graduação, José Carlos de Medeiros, Denise Muniz e Antonio Dias pelo suporte nos bastidores dos cursos de mestrado e doutorado.

Ao *Forsyth Institute* por ter me recebido e permitido analisar as amostras deste estudo.

Aos pacientes que participaram deste estudo que foram extremamente colaboradores e permitiram que este trabalho pudesse ser realizado.

Também agradeço, particularmente, aos membros da banca do exame de qualificação: Professores Carlos Marcelo da Silva Figueredo, José Nelson Mucha, Marco Antonio de Oliveira Almeida, Raphael Hirata Júnior e Robert Willer Farinazzo Vitral.

À Faperj pelo suporte financeiro.

E a todos aqueles que colaboraram de alguma forma na execução deste trabalho.

Aqueles que se enamoram somente da prática, sem cuidar da teoria - ou melhor, desprezando a ciência - são como o piloto que embarca sem timão nem bússola. A prática deve alicerçar-se sobre uma boa teoria, à qual serve de guia à perspectiva; ao não se entrar por esta porta, nunca se poderá fazer coisa perfeita nem na pintura, nem em nenhuma outra profissão.

Leonardo da Vinci

RESUMO

MARTINS, Cristiane Canavarro Rodrigues. *Avaliação dos níveis de metaloproteinases da matriz no fluido gengival durante a movimentação dentária ortodôntica*. 2010. 68 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Durante o tratamento ortodôntico, a resposta inicial dos tecidos periodontais ao estímulo mecânico envolve várias alterações estruturais e bioquímicas que permitem a movimentação do dente. As metaloproteinases da matriz (MMPs) parecem desempenhar um papel importante na manutenção da integridade funcional da matriz extracelular periodontal. O objetivo do presente estudo foi avaliar, em diferentes intervalos de tempo, os níveis de metaloproteinases da matriz -1, -2, -3, -7, -8, -12 e -13 no fluido gengival (FG) de caninos superiores submetidos ao movimento de distalização e testar a hipótese de possíveis alterações nos níveis destas MMPs com o emprego de forças ortodônticas. Amostras de FG foram obtidas de dezesseis pacientes ortodônticos saudáveis (nove do sexo masculino e sete do sexo feminino, com idades entre 13 e 27 anos, média de idade 17,7 anos) que possuíam indicação de exodontias dos primeiros pré-molares superiores e tiveram os caninos distalizados como parte da terapia ortodôntica. Um dos caninos superiores foi distalizado ortodonticamente, sendo considerado dente teste. O canino contralateral não foi submetido a nenhuma força, no entanto foi incluído na aparatologia ortodôntica e utilizado como controle. A coleta de FG foi realizada nos sítios mesial (tensão) e distal (pressão) dos dentes testes e controles 7 dias antes da montagem da aparatologia ortodôntica, imediatamente após a aplicação da força ortodôntica, e após 1 h, 24 h, e 7, 14 e 21 dias, respectivamente denominados -7d, 0h, 1h, 24h, 7d, 14d e 21d. A arcada superior de cada paciente foi dividida em um lado teste e um lado controle. Os resultados mostraram que foram encontradas diferenças significativas no volume do FG apenas nos intervalos de tempo entre -7d e 0h nos lados controle-pressão (CP), teste-tensão (TT) e teste-pressão (TP). Em TP foi observado ainda aumento do volume entre os tempos 0h e 14d. Foi possível detectar no FG as MMPs estudadas nos lados controle/teste e lados pressão/tensão, em todos os intervalos de tempo. As flutuações dos níveis das MMPs apresentaram poucas alterações significativas nos diferentes intervalos de tempo, nos lados controle/teste e lados pressão/ tensão. As diferenças intergrupos (TT, TP, CT e CP) em cada tempo não mostraram resultados significativos assim como as comparações entre os lados pressão e tensão para cada tempo individualmente. Os níveis de expressão da MMP-8 foram muito superiores aos das outras MMPs avaliadas, porém sem diferenças significativas entre os lados teste e controle.

Palavras-chave: Metaloproteinases da matriz. Periodonto. Fluido do sulco gengival. Movimentação dentária. Ortodontia.

ABSTRACT

During orthodontic treatment, the initial response of periodontal tissues to mechanical stress involves several structural and biochemical changes that allow the tooth movement. The matrix metalloproteinases (MMPs) seem to play an important role in maintaining the functional integrity of periodontal extracellular matrix. The aim of this study was to evaluate, in different periods, the levels of matrix metalloproteinases -1, -2, -3, -7, -8, -12 and -13 in gingival crevicular fluid (GCF) of the superior canines submitted to distalization movement and test the hypothesis of possible changes in these MMP's levels with the use of orthodontic forces. GCF samples were obtained from sixteen healthy orthodontic patients (nine males and seven females with ages ranging between 13 and 27 years, mean age 17.7 years) who had indication of first superior bicuspids extraction with cuspids distalization as part of orthodontic treatment. One maxillary canine was subjected to a distalizing force, and considered as the test tooth. The contralateral canine, which was not subjected to any force but was included in an orthodontic appliance, was used as a control. GCF sampling was performed at both mesial (tension) and distal (pressure) sites of the controls and test teeth 7 days before applying the orthodontic appliance, immediately before applying the orthodontic force, and after 1 h, 24 h, and 7, 14 and 21 days, respectively called -7d, 0h, 1h, 24h, 7d, 14d and 21 d. The results showed significant differences in the GCF volume only in time intervals of 0h-7d on control-pressure (CP), test-tension (TT) and test-pressure (TP) sides. In TP side was observed an increase in volume between the time 0h and 14d. It was possible to detect in GCF all MMPs studied on control/test sides and pressure/tension sides at all periods. Fluctuations in levels of MMPs showed few significant changes in different periods on the sides control/test and pressure/tension. The differences between the groups (TT, TP, CT and CP) in each time showed no significant results as well as the comparisons between pressure and tension sides for each period individually. The expression levels of MMP-8 were much higher than those of other MMPs evaluated, but with no significant differences between sides test and control.

Keywords: Matrix metalloproteinases. Periodontium. Gingival crevicular fluid. Tooth movement. Orthodontics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Lado teste: com aplicação de força ortodôntica através da colocação de mola de níquel-titânio ativa..... 36
- Figura 2 – Lado controle: sem aplicação de força, com dispositivo semelhante ao do lado teste, porém sem a mola de níquel-titânio..... 36
- Figura 3 – Coleta do fluido gengival: tira de papel absorvente em posição..... 38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Índices de placa visível e de sangramento gengival ao longo do tempo.....	43
Gráfico 2 – Flutuações dos níveis de FG e das MMPs -1, -2, -3, -7, -8, 12 e -13 (pg/sítio) durante os diferentes intervalos de tempo da movimentação ortodôntica no lado tensão, comparando-se os lados controle e teste.....	49
Gráfico 3 – Flutuações dos níveis de FG e das MMPs -1, -2, -3, -7, -8, 12 e -13 (pg/sítio) durante os diferentes intervalos de tempo da movimentação ortodôntica no lado pressão, comparando-se os lados controle e teste.....	50
Gráfico 4 – Alterações do volume do fluido gengival no lado de tensão nos lados controle e teste a partir de suas médias.....	51
Gráfico 5 – Alterações do volume do fluido gengival no lado de pressão nos lados controle e teste a partir de suas médias.....	52
Gráfico 6 – Alterações do volume do fluido gengival nos lados controle/teste, tensão/pressão a partir de suas médias.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Medianas (MDN) e desvios-padrão (DP) dos IPV e ISG ao longo do tempo. São apresentados também os valores de P de Friedman e as diferenças inter-tempos.....	43
Tabela 2 –	Medianas (MDN), distâncias interquartílicas (DI) e análise estatística com valores de P de Friedman avaliando cada MMP testada ao longo do tempo no lado CT.....	44
Tabela 3 –	Medianas (MDN), distâncias interquartílicas (DI) e análise estatística com valores de P de Friedman avaliando cada MMP testada ao longo do tempo no lado CP.....	46
Tabela 4 –	Medianas (MDN), distâncias interquartílicas (DI) e análise estatística com valores de P de Friedman avaliando cada MMP testada ao longo do tempo no lado TT.....	47
Tabela 5 –	Medianas (MDN), distâncias interquartílicas (DI) e análise estatística com valores de P de Friedman avaliando cada MMP testada ao longo do tempo no lado TP.....	48
Tabela 6 –	Médias (MED) e desvios-padrão (DP) do volume do fluido gengival em μl nos lados controle e teste nas áreas de pressão e tensão ao longo do tempo. São apresentados também os valores de P de ANOVA e as diferenças inter-tempos para as comparações inter-grupos.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl –	Microlitro
ANOVA –	Análise de variância
cN –	Centinewton
CT –	Controle-tensão
DI –	Distâncias interquartílica
DP –	Desvio-padrão
ENCODE –	Encode Project Consortium
FG –	Fluido gengival
IL-1β –	Interleucina 1β
IPV –	Índice de placa visível
ISG –	Índice de sangramento gengival
LP –	Ligamento periodontal
MDN –	Mediana
MED –	Média
MMP –	Metaloproteinase da matriz
MMP-1 –	Metaloproteinase-1 da matriz
MMP-2 –	Metaloproteinase-2 da matriz
MMP-3 –	Metaloproteinase-3 da matriz
MMP-7 –	Metaloproteinase-7 da matriz
MMP-8 –	Metaloproteinase-8 da matriz
MMP-12 –	Metaloproteinase-12 da matriz
MMP-13 –	Metaloproteinase-13 da matriz
ng –	Nanograma
OPG –	Osteoprotegerina
pg –	Picograma
RANK –	Ativador do receptor do fator nuclear Kappa B
RANKL –	Ligante do ativador do receptor do fator nuclear Kappa B
RNA _m –	RNA mensageiro
rpm –	Rotações por minuto
TIMPs –	Inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz

LISTA DE SÍMBOLOS

-7d –	Sete dias antes do início da aplicação da força ortodôntica
0h –	Momento imediatamente antes da aplicação de força
1h –	Uma hora após a aplicação da força
24h –	Vinte e quatro horas após a aplicação da força
7d –	7 dias após a aplicação da força
14d –	14 dias após a aplicação da força
21d –	21 dias após a aplicação da força

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1	Fluido Gengival (FG)	18
1.1.1	<u>Métodos de coleta e mensuração do fluido gengival</u>	19
1.2	Efeito do movimento dentário ortodôntico sobre os tecidos periodontais	20
1.2.1	<u>Efeitos sobre os tecidos gengivais</u>	21
1.2.2	<u>Efeitos sobre o ligamento periodontal</u>	23
1.2.3	<u>Efeitos sobre o tecido ósseo</u>	25
1.3	Metaloproteinases da Matriz (MMPs) e movimento dentário ortodôntico	27
2	PROPOSIÇÃO	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	Seleção de pacientes	34
3.2	Controle periodontal	34
3.3	Dispositivo Ortodôntico	35
3.4	Monitoramento imunológico	37
3.4.1	<u>Coleta de amostras de fluido gengival</u>	37
3.4.2	<u>Multianálise imunoenzimática com microesferas</u>	38
3.4.3	<u>Luminex 100[®]</u>	40
3.5	Análise estatística	41
4	RESULTADOS	42
4.1	Clínicos	42
4.2	Periodontais	42
4.3	Metaloproteinases da matriz	43
4.4	Fluido gengival	51
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICE - Termo de consentimento	67
	ANEXO – Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto	68

INTRODUÇÃO

O tratamento ortodôntico baseia-se no princípio biológico de que a pressão prolongada exercida sobre os dentes resulta na remodelação das estruturas periodontais, permitindo a movimentação dentária (2000; TUNCER et al., 2005). Esta movimentação resulta de uma combinação de reações inflamatórias que ocorrem em resposta à força mecânica e que são caracterizadas por alterações vasculares e celulares no periodonto estimulando a expressão de substâncias biologicamente ativas como enzimas e citocinas (SANDY; FARNDAL; MEIKLE, 1993; KYRKANIDES; O'BANION; SUBTELNY, 2000; IWASAKI et al., 2001; REDLICH et al., 2001; TAKAHASHI et al., 2003; INGMAN et al., 2005; TUNCER et al., 2005).

As células mais abundantes no periodonto são os fibroblastos e estas células produzem metaloproteinases da matriz (MMPs) e inibidores teciduais das metaloproteinases da matriz (TIMPs) que parecem desempenhar um papel importante na manutenção da integridade funcional da matriz extracelular periodontal (APAJALAHTI et al., 2003; NAHM et al., 2004).

MMPs representam um grupo de pelo menos 25 enzimas proteolíticas que contribuem para a degradação e remodelação da matriz extracelular (KYRKANIDES; O'BANION; SUBTELNY, 2000; CANTARELLA et al., 2006; BILDT et al., 2009)

Durante a movimentação ortodôntica, a matriz extracelular de colágeno do ligamento periodontal (LP) e do osso alveolar é remodelada. As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas que atuam na remodelação do LP, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (KYRKANIDES; O'BANION; SUBTELNY, 2000; APAJALAHTI et al., 2003; BILDT et al., 2009). As células endoteliais possuem capacidade de produzir MMPs e de sintetizar colágeno extracelular, contribuindo para constante degradação e reconstrução da vascularização periodontal e remodelação da matriz extracelular durante a movimentação dentária (KYRKANIDES; O'BANION; SUBTELNY, 2000).

Considera-se que os tecidos periodontais respondem rapidamente ao estresse mecânico com conseqüentes mudanças metabólicas que permitem o movimento dentário. Uma maneira de avaliar estas mudanças é através da análise da composição do fluido gengival (FG). Este é um método simples e não invasivo que tem sido utilizado para investigar a resposta celular no ligamento periodontal durante o tratamento ortodôntico. Os níveis de mediadores pró-inflamatórios quantificados no FG proporcionam uma medição indireta das mudanças que ocorrem nos tecidos periodontais, durante a movimentação ortodôntica. Uma variedade de

substâncias envolvidas na remodelação do periodonto e produzidas pelas células do LP em quantidade suficiente para serem identificadas no FG tem sido bem documentada (APAJALAHTI et al., 2003; INGMAN et al., 2005; TUNCER et al., 2005; CANTARELLA et al., 2006; DUDIC et al., 2006; CAPELLI JÚNIOR, 2007; BILDT et al., 2009). A idéia de que a compressão do ligamento periodontal resulta na migração dos produtos bioquímicos para o sulco gengival é a base para o desenho experimental de muitas pesquisas que investigam a biologia do movimento dentário ortodôntico (BASARAN et al., 2006; CAPELLI JÚNIOR, 2007).

Desta maneira o presente trabalho considera a hipótese de que durante a movimentação dentária ortodôntica ocorre um aumento nos níveis de expressão das MMPs no fluido gengival, uma vez que estão envolvidas em diferentes fases da remodelação do colágeno e catalisam a degradação inicial da maioria das matrizes proteicas extracelulares de colágeno do ligamento periodontal.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Fluido Gengival (FG)

O fluxo do FG é um importante determinante na ecologia do sulco gengival ou bolsa periodontal sendo capaz de criar uma ação enxaguatória e um efeito de isolamento. Além disso, provavelmente determina o nível de crescimento de microorganismos subgengivais e é um potencial marcador para atividade de doença periodontal (BICKEL; CIMASONI; ANDERSEN, 1985; GOODSON, 2003; GRIFFITHS, 2003; UITTO, 2003).

O FG é uma complexa mistura de substâncias derivadas do soro, enzimas de células inflamatórias, leucócitos, células estruturais do periodonto, bactérias orais, uma variedade de citocinas inflamatórias e emerge entre a superfície do dente e o epitélio tegumentar (BICKEL; CIMASONI; ANDERSEN, 1985). O FG é formado como um ultrafiltrado sangüíneo que acumula elementos tanto do metabolismo bacteriano quanto de células do hospedeiro, sua composição constitui um enfoque lógico de métodos para diagnosticar doenças da região periodontal. Análises de componentes de FG têm permitido avaliar a relação entre hospedeiro humano e bactéria oral (GOODSON, 2003; UITTO, 2003).

O fluxo do fluido gengival é o processo de movimentação de entrada e saída do FG do sulco gengival ou bolsa periodontal, com um volume de poucos microlitros (μl) por hora. O FG presente no sulco gengival ou bolsa periodontal é como um tanque de uma fonte alimentadora. O fluido entra no tanque por uma nascente e sai através da margem. Este fluido pode ser mensurado como o volume presente em determinada região do sulco gengival em determinado momento (GOODSON, 2003).

O volume de FG é mais comumente medido inserindo-se um tira de papel no sulco gengival ou bolsa periodontal, permitindo que o fluido se acumule por um período relativamente curto de tempo, normalmente em torno de 30 segundos. Este volume pode mensurado por um instrumento chamado Periotron[®] (GOODSON, 2003).

Lamster et al. (1985) avaliaram alterações no volume de amostras de FG durante estudo de gengivite experimental realizado com participação de oito estudantes do sexo masculino com idades entre 23 e 29 anos. Após um período de intenso cuidado com a higiene oral, esta foi suspensa no quadrante superior esquerdo por quatro semanas. Uma tira de papel foi inserida no sulco gengival por 30 segundos e o volume foi determinado. Os resultados

indicaram que os volumes de FG coletados aumentaram linearmente durante o período da gengivite induzida.

Tuncer et al. (2005) avaliaram alterações no volume de FG nos lados de pressão e tensão, em pacientes que apresentavam indicação de extração de primeiros pré-molares, em diferentes períodos do tratamento ortodôntico: antes da aplicação da força, uma hora, 24 horas, 6 dias, 10 dias e 30 dias após a aplicação da força. Os resultados mostraram aumento do volume de FG no lado tensão após 24 horas e no lado pressão na primeira hora com diminuição após 10 dias. Após 30 dias foi observado aumento em ambos os lados. Segundo os autores, estes resultados sugerem que o trauma mecânico seria o responsável pela resposta inflamatória precoce determinada pelos altos níveis de FG.

Dilsiz et al. (2010) avaliaram as alterações nos níveis de volume de FG em 22 pacientes ortodônticos comparando lados teste e controle em intervalos de 0, 1, 24 e 168 horas. Os resultados mostraram que as médias de volume de FG coletadas nos dentes do lado controle foram similares às coletadas nos dentes do lado teste.

Três princípios básicos devem ser observados durante o desenvolvimento do projeto de um estudo envolvendo FG: 1) O instrumento de medição deve estar calibrado, 2) Os sítios avaliados devem estar isolados da saliva; 3) A área isolada deve ser seca por um fluxo de ar suave (GOODSON, 2003).

1.1.1 Métodos de coleta e mensuração do fluido gengival

Apesar da existência do FG ter sido reconhecida há mais de cem anos (BLACK apud GRIFFITHS, 2003) a natureza exata do fluido, sua origem e composição tem sido objeto de controvérsia. Isto pode ser um resultado de variações na quantidade ou natureza do fluido produzido sob diferentes condições clínicas e a utilização de uma larga variedade de métodos de coleta de amostra (GRIFFITHS, 2003).

Diversas técnicas têm sido empregadas na coleta de FG e a técnica escolhida dependerá dos objetivos do estudo, pois cada técnica apresenta vantagens e desvantagens.

No método de lavagem gengival, uma solução isotônica, solução de Hank, normalmente em volume fixo, é aspergida no FG para em seguida ser reaspirada. O fluido coletado, portanto, representa uma diluição do FG e contém tanto células e constituintes solúveis quanto proteínas plasmáticas. Esta técnica é particularmente importante na coleta do

máximo de células da região. No entanto, pode ser que não se consiga aspirar todo o fluido durante o processo de reaspiração. Portanto, a quantificação precisa do volume ou composição do fluido não é possível já que o fator preciso de diluição não pode ser determinado (GRIFFITHS, 2003).

No método de túbulos capilares ou micropipetas, túbulos capilares de conhecido diâmetro interno são inseridos na entrada do sulco gengival. O FG migra para dentro do túbulo por ação de capilaridade e seu volume é determinado precisamente pela mensuração da distância em que o FG tenha migrado. Apesar de parecer ser a técnica ideal, possui a desvantagem de dificuldade de coleta de uma quantidade de volume de fluido adequado em curtos períodos, a não ser que o sítio esteja inflamado e com grande volume de fluido. Para coletar um volume de fluido razoável é necessário, em alguns casos, um tempo de coleta superior a 30 minutos e, ainda assim, amostras adequadas de sítios saudáveis podem ser impossíveis de serem obtidas. Outra desvantagem da técnica é a dificuldade de remoção de toda a amostra do túbulo (GRIFFITHS, 2003).

A técnica de coleta com tiras de papéis absorventes, Periopaper[®], possui a vantagem de ser rápida e fácil, poder ser aplicada em todos os sítios e, possivelmente, ser menos traumática quando corretamente utilizada (GRIFFITHS, 2003; TUNCER et al., 2005).

Nos primeiros estudos com utilização do Periopaper[®] o volume do fluido era medido através de técnica de coloração das tiras. No entanto, o tempo decorrido entre a coleta e a mensuração poderia resultar em alteração do volume devido à evaporação do fluido gengival. Outra desvantagem diz respeito à impossibilidade de analisar a composição das tiras em laboratório devido à coloração. O surgimento do Periotron[®] permitiu uma determinação precisa do volume de fluido e subsequente avaliação laboratorial da composição da amostra. Uma das limitações do Periotron[®] é a inabilidade de mensurar volumes maiores que 1,0 µl (GRIFFITHS, 2003).

1.2 Efeito do movimento dentário ortodôntico sobre os tecidos periodontais

O objetivo do tratamento ortodôntico corretivo é provocar mudanças no posicionamento dos dentes anormalmente posicionados. Isto é conseguido através da aplicação de força mecânica no dente que, por sua vez, afeta o ligamento periodontal, o osso alveolar e gengiva (DAVIDOVITCH, 1991; APAJALAHTI; SORSA; INGMAN, 2003). A

aplicação desta força provoca a reabsorção do osso e degradação do LP em algumas áreas. Ao final do tratamento, a integridade e as dimensões de ambos os ossos e do LP são restauradas (REDLICH et al., 2001).

1.2.1 Efeitos sobre os tecidos gengivais

A literatura ortodôntica privilegia os estudos sobre a resposta do LP e principalmente a remodelação do osso alveolar à força ortodôntica. No entanto, as características da gengiva devem ser consideradas como um importante fator nas alterações teciduais envolvidas na movimentação dentária (REDLICH; SHOSHAN; PALMON, 1999).

A gengiva é composta de epitélio e tecido conjuntivo que é ligado à parte externa do osso alveolar e à região supracrestal do dente. As fibras colágenas são os componentes estruturais principais da matriz extracelular da gengiva. Uma gengiva sadia contém colágeno intersticial do tipo-I (90%), colágeno tipo-III (8%) e colágeno tipo IV, V, VI e VIII (2%). A análise ultra-estrutural revela dois padrões na disposição do colágeno gengival: 1- largas fibras de colágeno tipo-I, na sua maioria dispostas paralelamente e interpostas por finas fibrilas. Esta disposição das fibras colágenas confere elasticidade e rigidez ao tecido, que sustenta as intensas forças mastigatórias; 2- fibras curtas e finas, em uma malha reticular localizada principalmente na membrana basal do epitélio e ao redor dos vasos sanguíneos (TERVAHARTIALA, 2003).

As fibras colágenas da gengiva estão reunidas de acordo com a sua origem e inserção. Os grupos mais importantes são as fibras dento-gengivais e as fibras transeptais. O colágeno gengival tem um ritmo intenso de remodelação. As fibras transeptais têm uma taxa particularmente elevada de remodelação, sendo tão elevada quanto à do colágeno do ligamento periodontal (REDLICH; SHOSHAN; PALMON, 1999).

O alto ritmo do metabolismo do colágeno gengival é uma característica fisiologicamente intrínseca, tornando-o capaz de manter sua integridade, pelo equilíbrio entre a síntese e a degradação. Além da rede colágena, a gengiva também contém uma rede de fibras elásticas, que compreende 6% do total proteico da gengiva humana. Esta rede é composta por três diferentes tipos de fibras, chamadas elásticas, elaunínicas e fibras oxitalânicas, que dão propriedades elásticas à gengiva, necessárias como proteção às forças de compressão. A matriz extracelular da gengiva também contém proteoglicanas, que são

macromoléculas proteicas organizadoras da matriz extracelular com importante papel na manutenção da integridade estrutural do tecido conjuntivo (LINDHE; LANG; KARRING, 2008).

Os fibroblastos representam as células presentes em maior abundância no tecido gengival, com um volume que compreende 5,6% do total do volume gengival. Outras células presentes na gengiva são os macrófagos, linfócitos, mastócitos, células endoteliais e células nervosas. A função dos fibroblastos e outras células está intimamente associada com a matriz extracelular, que proporciona um apropriado microambiente para a atividade celular. Este efeito na matriz extracelular é mediado por receptores celulares específicos, fazendo com que a integridade funcional do tecido gengival seja mantida por estas interações célula-matriz extracelular (REDLICH; SHOSHAN; PALMON, 1999).

Ao contrário do osso e do ligamento periodontal, o tecido gengival não é reabsorvido durante o tratamento ortodôntico, mas sim comprimido e conseqüentemente retraído. O fato de a força ortodôntica não produzir reabsorção gengival, previne a formação de bolsa periodontal e subseqüentemente a perda de inserção. As fibras colágenas são inicialmente rompidas durante a aplicação das forças ortodônticas, mas os genes para colágeno e elastina são ativados enquanto que os de colagenase são inibidos, modificando a composição da matriz extracelular da gengiva (REDLICH; SHOSHAN; PALMON, 1999).

Durante o tratamento ortodôntico com utilização de aparelhagem fixa, é importante que o periodonto esteja saudável e com ausência de acúmulo de placa bacteriana (INGMAN et al., 2005). Estudos prévios avaliaram a associação da presença de gengivite ao tratamento ortodôntico corretivo no qual aparelhagem fixa foi utilizada (RATEITSCHAK; HERZOG-SPECHT; HOTZ, 1968; ZACHRISSON, 1972; KUROL; RONNERMAN; HEYDEN, 1982).

Zachrisson (1972) avaliou histologicamente 48 amostras de 2,0 mm e largura de tecidos comprimidos provenientes da gengiva marginal até a crista alveolar da região vestibular dos primeiros molares. As amostras foram removidas com trauma mínimo de 16 pacientes com idades entre 11 e 15 anos em diferentes intervalos do tratamento ortodôntico, incluindo o período de contenção. Os resultados mostraram que as biópsias obtidas no começo do tratamento ortodôntico continham poucas células inflamatórias, a maioria linfócitos. As amostras removidas em fases mais avançadas do tratamento revelaram aumento de células mononucleares com plasmócitos e predomínio de linfócitos. Estas alterações persistiram durante o tratamento, inclusive em alguns pacientes com boa higiene oral. Após a remoção da aparelhagem ortodôntica as alterações celulares e vasculares regrediram dentro de poucos meses. A gengiva retornou gradualmente a condições normais apesar de poder haver

possibilidade de persistência de espessamento do epitélio da bolsa. Apesar de as observações histológicas geralmente confirmarem a presença clínica de gengivite, o grau de correlação entre o aspecto clínico e as observações histológicas foi moderada. Os achados deste trabalho complementam a experiência clínica de Rateitschak, Herzog-Specht e Hotz (1968) na qual as alterações gengivais representariam reações aos produtos da placa bacteriana ao invés de reação às forças ortodônticas.

1.2.2 Efeitos sobre o ligamento periodontal

O ligamento periodontal é composto principalmente pelos colágenos dos tipos I e III que conectam o osso alveolar às raízes dos dentes, mantendo o dente em posição e dissipando forças multidirecionais de tensão e compressão. Ele é constituído por uma complexa rede de células multi-populacionais, incluindo fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais e macrófagos. Cada uma destas células ajuda a manter os tecidos do LP através da produção de colágeno fibrilar, fornecimento de sangue ou promovendo a resposta inflamatória (TAKAHASHI et al., 2003).

Uma das características do colágeno do LP é o seu metabolismo extremamente rápido. Esta alta taxa de metabolismo pode estar associada com a habilidade do LP em se adaptar rapidamente a situações únicas e específicas como erupção dentária, mastigação e movimentos dentários ortodônticos (BERKOVITZ, 1990).

Diversas reações em cadeia, envolvendo centenas de genes e milhares de proteínas, ocorrem nas células do LP e osso alveolar transformando a força mecânica em eventos moleculares que possibilitarão a movimentação ortodôntica (INGMAN et al., 2005; MASELLA; MEISTER, 2006). Forças ortodônticas causam distorção física das células do LP e osso alveolar, iniciando várias reações em cascata que afetam estas células. A distorção da matriz extracelular e da célula inicia-se com alterações estruturais e funcionais na membrana celular e proteínas do citoesqueleto. Simultaneamente, diversas proteínas da submembrana se associam em “adesão focal celular”. Estas complexas adaptações funcionais/estruturais transmitem sinais de sobrevivência e crescimento ao citoplasma e auxiliam na mediação de adesão celular (APAJALAHTI et al., 2003; MASELLA; MEISTER, 2006).

A aplicação de uma força ortodôntica cria áreas de tensão e pressão no LP com extensão e localização dependentes do tipo de movimento dentário desejado. Nas áreas de

tensão há um alargamento do ligamento periodontal e estiramento das fibras periodontais. As fibras precisam ser alongadas para o dente se deslocar. Ocorre, então, uma rápida proliferação de fibroblastos no período de oito a quarenta horas após a aplicação da força (REITAN, 1951). Fibroblastos estão distribuídos desigualmente por todo o LP alargado, tendo a menor concentração localizada próximo à raiz do dente e a maior encontrada próximo ao osso alveolar (DAVIDOVITCH, 1991).

Mudanças vasculares subseqüentes ocorrem com a dilatação dos capilares sanguíneos e aumento na atividade vascular. Macrófagos são encontrados em grande número próximos aos vasos sanguíneos nas zonas de tensão. Ao se empregar forças de grande intensidade, são encontradas mudanças degenerativas nos capilares venosos, com hemorragia e morte celular (OPPENHEIM, 1944).

Ao se aplicar forças ortodônticas o volume de colágeno é reduzido nos primeiros três dias assim como o suprimento vascular. A degradação do colágeno é mediada pelas collagenases produzidas pelos macrófagos ou pelos fibroblastos através da interação macrófago-fibroblasto. As enzimas responsáveis pela degradação do colágeno são moduladas pelo estresse mecânico. É possível que a reabsorção do colágeno periodontal seja influenciada pela alteração da produção do inibidor de collagenase e pode ocorrer sem atividade fagocítica dos fibroblastos. Assim que migram a partir do osso, os fibroblastos secretam fibras e fibrilas colágenas que são incorporadas às fibras já existentes, permitindo que o estiramento ocorra. As fibras antigas são expostas pelo osso que está avançando, enquanto o novo colágeno secretado é incorporado tanto no osteóide como no LP (TEN CATE; ANDERSON, 1986; SANDY, 1992; SANDY; FARNDAL; MEIKLE, 1993).

Nas zonas de pressão os espaços do LP diminuem no período inicial subseqüente à aplicação da força ortodôntica. Mesmo utilizando forças de baixa intensidade, a compressão do suprimento sanguíneo em áreas limitadas da membrana periodontal é muitas vezes inevitável. Isso leva a uma necrose local do ligamento, trombose, degeneração dos vasos sanguíneos e cristalização dos eritrócitos. O resultado é uma área necrótica estéril (hialinização) que é usualmente limitada a 1 a 2 mm em diâmetro, mas pode ser ampliada como resultado da sustentação de uma força ortodôntica de grande intensidade (REITAN, 1951; RYGH, 1972).

O suprimento sanguíneo no LP é reduzido, mas é mantido quando forças de baixa intensidade são utilizadas. Assim, a atividade celular aumenta com a diferenciação dos fibroblastos e osteoclastos. A reabsorção do colágeno ocorre de forma similar ao lado de tensão, suportada pelo aumento da vascularização e acompanhado pelos macrófagos, com

reabsorção do osso alveolar e aumento do espaço do LP (REITAN; RYGH, 1994). Estas mudanças são acompanhadas de mudanças nos níveis de glucosaminoglicanas detectadas no fluido gengival (LAST; DONKIN; EMBERY, 1988; SAMUELS; PENDER; LAST, 1993; PENDER; SAMUELS; LAST, 1994).

A regeneração e proliferação de vasos sanguíneos dentro da zona de pressão usualmente ocorrem após sete dias. Quando a zona de hialinização persiste, o movimento dentário é interrompido. As células não podem diferenciar-se em osteoclastos e não ocorre reabsorção óssea a partir do ligamento periodontal (RYGH et al., 1986; REITAN; RYGH, 1994). A remoção da zona hialinizada ocorre através da invasão da área necrótica por células e vasos sanguíneos do LP vizinho não danificado (DAVIDOVITCH, 1991). A penetração dos capilares na zona hialinizada parece ser um fator importante no processo de remoção e reparo, com macrófagos sendo encontrados extensivamente nas áreas perivasculares. Os macrófagos digerem e removem completamente a área hialinizada e o osso alveolar adjacente é removido por reabsorção por solapamento. A área pós-hialinizada é caracterizada por uma intensa atividade celular, restabelecendo os feixes de fibras colágenas funcionalmente orientadas e uma nova camada de cemento e osso alveolar. Estas mudanças estão associadas com o alargamento do espaço do LP, mas que é restaurado a dimensões normais quando a remodelação está completada (HEASMAN; MILLETT; CHAPPLE, 1996; THILANDER; RYGH; REITAN, 2002).

1.2.3 Efeitos sobre o tecido ósseo

O metabolismo ósseo durante o movimento ortodôntico é caracterizado pela ativação sincronizada de numerosas unidades ósseas multicelulares com períodos distintos de deposição e reabsorção nos lados de tensão e pressão (MASELLA; MEISTER, 2006).

A reabsorção envolve a remoção de componentes minerais e orgânicos da matriz óssea extracelular pelas células osteolíticas, principalmente osteoclastos. O osteócito também pode atuar na reabsorção local. A invasão de osteoclastos ocorre em duas etapas. Na primeira, os osteoclastos são derivados de populações celulares locais que chegam horas após aplicação da força. A segunda etapa pode ocorrer após mais de dois dias e as células são transportadas pelo sistema vascular. Pré-osteoclastos chegam ao local por via sanguínea sendo transformados em osteoclastos ativos na superfície óssea e os osteoblastos possuem papel fundamental neste

processo. Apesar de os osteoclastos representarem as principais células de reabsorção, os osteoblastos possuem receptores para a maioria dos agentes de reabsorção como o hormônio paratireóide, eicosanóides, vitamina D e citocinas. Os osteoblastos também liberam colagenase em resposta ao hormônio paratireóide facilitando a reabsorção pelos osteoclastos. Portanto, existe uma complexa interação entre osteoblastos e osteoclastos para produzir a reabsorção óssea (MASELLA; MEISTER, 2006).

Antes que o movimento ortodôntico possa ocorrer é necessário que o osso alveolar seja reabsorvido na zona de pressão do LP, ou seja, no lado para o qual a força é dirigida, enquanto novo osso trabecular é formado nas áreas de tensão, na posição contralateral. Com a utilização de forças moderadas a pesadas, ocorre forte compressão das fibras do tecido conjuntivo sobre as áreas de pressão gerando restrição de suprimentos de oxigênio e nutrição com conseqüente isquemia do LP. Após vários dias de trauma, pode ser observada atividade osteoclástica próximo aos tecidos necróticos, onde são visualizadas células relativamente saudáveis do ligamento disponíveis para as atividades de reparação (TUNCER et al., 2005).

A reabsorção óssea é conseguida pela secreção de ácidos orgânicos, enzimas lisossomiais e metaloproteinases (KEELING et al., 1993). Essas substâncias dissolvem os cristais de hidroxiapatita e reabsorvem a matriz orgânica no processo chamado “reabsorção frontal” e o movimento dentário se inicia. A reabsorção frontal é caracterizada histologicamente pelo alargamento da membrana periodontal e os osteoclastos são espalhados sobre a uma extensa área da superfície do osso alveolar (REITAN; RYGH, 1994). Quando a hialinização ocorre, os osteoclastos aparecem nas superfícies dos espaços medulares adjacentes ou na superfície do processo alveolar e o osso alveolar adjacente é removido por reabsorção solapante. Em humanos, o período de hialinização demora aproximadamente 2 ou 3 semanas. Quando há uma alta densidade óssea, a duração é maior (THILANDER; RYGH; REITAN, 2002).

O processo da reabsorção óssea é muito mais rápido que o da aposição óssea. Um período de três meses é necessário para recolocar osso que foi reabsorvido em apenas duas ou três semanas. A genética molecular que regula a função e diferenciação dos osteoclastos parece ser mais simples que a dos osteoblastos (MASELLA; MEISTER, 2006). O resultado clínico é um aumento na prevalência de mobilidade dentária durante o tratamento ortodôntico. Mobilidade exagerada pode indicar força excessiva. A cicatrização, no entanto, inicia-se após a remoção da força, apesar de poder se estender por um período extenso. Essa diferença de sincronia entre a remoção de tecido e a osteogênese também contribui para a necessidade de contenção dos dentes recentemente movimentados (HUANG; KING; KAPILA, 2005).

A base de comunicação entre osteoblastos e osteoclastos é uma proteína de superfície celular, que está localizada na superfície dos osteoblastos e é responsável pela indução da osteoclastogênese. Esse fator de sinalização celular é denominado ligante ativador do receptor do fator nuclear Kappa B (RANKL). A união do RANKL ao seu receptor cognato, ativador do receptor do fator nuclear Kappa B (RANK), processada na superfície das células progenitoras de osteoclastos, induz a osteoclastogênese e ativa os osteoclastos. A molécula que inibe a osteoclastogênese é conhecida como osteoprotegerina (OPG) que é secretada pelos osteoblastos com a função de bloquear a formação de osteoclastos, assim como a reabsorção óssea. As interações RANKL-OPG constituem um sistema receptor-ligante que regula diretamente a diferenciação osteoclástica. O OPG age como um inibidor da osteoclastogênese por competição com o RANKL nos receptores da membrana celular. As evidências sugerem que a produção de RANKL e OPG no LP desempenha importante papel na regulação da remodelação do tecido conjuntivo e reabsorção óssea durante o movimento dentário ortodôntico (DOLCE; MALONE; WHEELER, 2002; KAWASAKI et al., 2006; MEIKLE, 2006). Portanto, RANK e RANKL são proteínas chaves reguladoras da função osteoclástica. A síntese de RANKL pelos osteoblastos e sua capacidade de promover a diferenciação osteoclástica suporta a idéia de que os osteoblastos controlam apenas a diferenciação osteoclástica, não sua função. (MASELLA; MEISTER, 2006).

O potencial de reabsorção óssea de cada paciente e os resultados da movimentação ortodôntica dependem do recrutamento de osteoclastos e precursores maduros, diferenciação osteoclástica e do número de osteoclastos funcionais na junção osso-ligamento periodontal. O sucesso clínico também depende de genes normais de osteoblastos e osteoclastos que expressem corretamente as proteínas necessárias em quantidades adequadas nos momentos e regiões corretos, incluindo moléculas reguladoras, como o fator de necrose tumoral, osteoprotegerina (OPG), ativador do receptor do fator nuclear Kappa B (RANK) e ligante do ativador do receptor do fator nuclear Kappa B (RANKL) (MASELLA; MEISTER, 2006).

1.3 Metaloproteinases da Matriz (MMPs) e movimento dentário ortodôntico

A remodelação da matriz extracelular é um passo crítico em diversos processos biológicos, tais como reparo tecidual, remodelação tecidual e movimento dentário ortodôntico. Devido à capacidade única que compartilham de clivar colágeno intersticial tri-

helicoidal, a colagenase-1 ou metaloproteinase da matriz-1(MMP-1) e colagenase-2 ou metaloproteinase da matriz-8 (MMP-8), podem dar início a esta remodelação tecidual. A degradação da MMP-8 por leucócitos polimorfonucleares está entre os fatores fundamentais na destruição patológica do colágeno durante doenças periodontais (INGMAN et al., 1996). A MMP-1 é sintetizada por muitos tipos celulares diferentes (INGMAN et al., 1996). Estudos *in vitro* avaliando fibroblastos periodontais e gengivais de seres humanos sob estresse mecânico mostraram elevadas taxas de síntese proteica e RNA mensageiro (RNAm) de MMP-1 (CARANO; SICILIANI, 1996). Foi também verificado que a força ortodôntica aumenta significativamente a expressão de MMP-1 nos tecidos gengivais de cães *in vivo* (REDLICH et al., 2001). Além disso, foi demonstrado que atividade da colagenase total mostra-se elevada no FG de pacientes sob tratamento ortodôntico (APAJALAHTI et al., 2003).

Enzimas proteolíticas são liberadas nos tecidos periodontais, durante a inflamação, por leucócitos, células epiteliais ativadas e tecido conjuntivo. Destas enzimas, as MMPs possuem a responsabilidade principal de degradação dos tecidos periodontais, a partir da quebra de componentes da matriz extra-celular. A função das MMPs em resposta às forças mecânicas no movimento dentário ortodôntico ainda não foi completamente esclarecido, no entanto, estudos recentes mostram que as MMPs também possuem funções específicas em controlar as reações teciduais de defesa e reparação (APAJALAHTI et al., 2003; INGMAN et al., 2005).

As MMPs são enzimas proteolíticas íon-zinco dependentes produzidas por uma grande variedade de células durante o processo de desenvolvimento, doenças inflamatórias, doenças articulares degenerativas, tumores invasivos, remodelação óssea, angiogênese e processos de cicatrização de feridas podendo ser reguladas em resposta a moléculas de adesão, fatores de crescimento, citocinas e hormônios (TAKAHASHI et al., 2003; BILDT et al., 2009).

Elas são classificadas em diferentes subgrupos: colagenases (MMPs -1, -8, -13), gelatinases (MMPs -2 e -9), estromelinas (MMP-3), matrilisinas (MMP-7), macrófago metaelastase (MMP-12) e outras subfamílias. A maioria das MMPs é produzida como pró-enzimas que são clivadas em um local específico para adquirir uma forma madura e em seguida, secretadas e ativadas na presença de íons zinco e cálcio. As MMPs degradam a matriz extracelular durante a remodelação e sua atividade é regulada por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (CANTARELLA et al., 2006; BILDT et al., 2009).

As colagenases, MMPs -1, -8 e -13, que clivam, principalmente, colágeno fibrilar nativo, poderiam ser consideradas as enzimas de maior atuação no LP (KYRKANIDES; O'BANION; SUBTELNY, 2000; TAKAHASHI et al., 2003; CANTARELLA et al., 2006). As gelatinases, MMP-2 e MMP-9 clivam colágeno desnaturado. Devido às propriedades de

atuação tardia, as gelatinases complementam a atuação das collagenases durante o processo de degradação do colágeno fibrilar (CANTARELLA et al., 2006)

A MMP-1 ou collagenase intersticial humana ou, ainda, collagenase-1, é sintetizada e secretada por células do tecido conjuntivo (fibroblastos) e macrófagos, sendo mais freqüentemente associada com a remodelação tecidual normal, hidrolisando principalmente o colágeno do tipo III (KIILI et al., 2002).

A MMP-8, ou collagenase neutrofílica humana ou, ainda, collagenase-2, é produzida não apenas por leucócitos polimorfonucleares mas também por outros tipos de células como fibroblastos gengivais, células ósseas e plasmáticas (INGMAN et al., 2005). A MMP-8 é a enzima mais eficiente na hidrolisação do colágeno tipo I e a principal collagenase intersticial presente na gengivite (KIILI et al., 2002). Devido ao fato da MMP-8 ser expressa nos fibroblastos do LP durante a erupção dentária, poderiam ser candidatas a enzimas proteolíticas que desempenham um papel crucial na remodelação do LP durante o movimento dentário (TSUBOTA et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2003).

Redlich et al. (2001), avaliaram o efeito da força ortodôntica sob os níveis de RNAm do colágeno tipo-I, MMP-1 e inibidores teciduais 1 e 2 (TIMPs) na gengiva de 24 cães. As amostras foram analisadas após 1, 2, 3, 7, 14 e 28 dias do início da aplicação da força utilizando-se RT-PCR e zimografia para determinar a atividade de MMP-1. Os resultados mostraram que a força ortodôntica induziu um aumento significativo nos níveis de RNAm e MMP-1 e de sua atividade intersticial. Após a remoção da força, a expressão do gene da MMP-1 reduziu significativamente.

Takahashi et al. (2003) realizaram experimentos *in vivo* e *in vitro* em ratos com o objetivo de avaliar a expressão do RNAm de MMP-8 e MMP-13 durante a remodelação do tecido do LP durante a movimentação dentária ortodôntica, nos lados de pressão e tensão. As amostras foram avaliadas após 2, 4, 7 e 14 dias do início da movimentação dentária. Os resultados mostraram aumento de ambas as MMPs no quarto dia no lado de tensão, retornando ao normal no dia 14. No lado de pressão a MMP-8 aumentou transitoriamente do segundo para o sétimo dias e a MMP-13 foi transitoriamente expressada nos segundo e quarto dias, mas não apareceu nos tecidos hialinizados. A MMP-8 foi expressa principalmente nas células que margeiam o cimento, porém não foi observada em outras células do LP, sugerindo que nestes outros locais outras MMPs poderiam estar envolvidas com a degradação do colágeno (TAKAHASHI et al., 2003).

Apajalahti et al. (2003) avaliaram formas moleculares da MMP-1 e da MMP-8 através de *Western blot* em pacientes sob tratamento ortodôntico. As amostras foram coletadas

imediatamente antes da aplicação da força e a cada hora durante um período de 8 horas após a aplicação desta força. Os resultados mostraram que o fluxo do FG não foi alterado significativamente pelo tratamento ortodôntico. No entanto, foi observado aumento significativo nos níveis de MMP-8 no FG de 4 a 8 horas após a aplicação da força, quando comparados a antes da aplicação e aos dentes controle. Os autores observaram rápida elevação dos níveis de MMP-8, após uma hora de aplicação de força sugerindo que esta MMP exerça um papel fundamental na remodelação do LP submetido a forças ortodônticas. No entanto, não foi possível detectar a expressão da MMP-1.

Ingman et al. (2005) realizaram um estudo piloto com a proposta de avaliar, *in vivo*, a presença, níveis e graus de ativação de MMP-1 e MMP-8 analisadas por *Western blot*, e os níveis de MMP-8 pelo ensaio imunofluorométrico quantitativo em pacientes saudáveis que estavam sendo tratados ortodonticamente com aparelhagem fixa. As amostras foram coletadas diariamente sendo realizada uma coleta antes da ativação e as demais durante 30 dias após a ativação da aparelhagem. Os níveis de MMP-8 no fluido gengival destes pacientes apresentaram-se mais baixos que aqueles avaliados em pacientes com gengivite e periodontite, porém significativamente maiores em relação ao grupo controle. No entanto, também não conseguiu detectar MMP-1 no FG dos pacientes ortodônticos da amostra.

Através da técnica de hibridização *in situ*, Takahashi et al. (2006) analisaram a expressão dos níveis de MMP-2, MMP-9 e TIMPs -1, -2 e -3 em dentes de ratos submetidos à movimentação. A expressão dos níveis destes genes esteve aumentada temporariamente nas células do periodonto, como cementoblastos, fibroblastos, osteoblastos e osteoclastos, no lado de pressão do dente sob movimento. O aumento temporário da expressão dos genes no lado de tensão foi limitado aos osteoblastos e cementoblastos. Concluiu-se, neste estudo, que os níveis de MMP-2 e MMP-9 aumentaram temporariamente em ambos os lados, pressão e tensão, durante o movimento dentário induzido, concomitante com o aumento dos genes para as TIMPs. A expressão dos níveis dos genes que codificam MMP-2, MMP-9, TIMPs -1, -2 e -3 aparecem para regular diferencialmente as várias regiões dos tecidos LP sob tensão e compressão. Estas diferenças no perfil de expressão dos genes podem regular combinatoriamente o ritmo e extensão da remodelação do colágeno da matriz extracelular do LP durante o movimento dentário ortodôntico.

Para avaliar os níveis de MMP-1 e MMP-2 no fluido gengival de pacientes ortodônticos Cantarella et al. (2006) observaram 11 pacientes com indicação de exodontia dos quatro primeiros pré-molares. Foi utilizada aparelhagem fixa no arco superior e o canino superior esquerdo foi utilizado como teste, sendo distalizado com 150 gramas de força. No

arco inferior, sem aparelhagem, o canino esquerdo foi considerado controle. Amostras do FG, nos lados de pressão e tensão foram coletadas 1, 2, 3, 4 e 8 horas após aplicação de força ortodôntica para análise em *Western blot*. Tanto no lado de pressão como no de tensão, a força aplicada induziu um aumento no nível de MMP-1 após uma hora, que permaneceu elevado até a terceira hora de aplicação de força e depois desapareceu. O nível de MMP-2 aumentou significativamente uma hora após a aplicação da força, no lado de tensão, mas retornou gradualmente aos níveis basais após 8 horas. No lado de pressão o nível foi dependente do tempo e atingiu seu pico após 8 horas. Não tendo havido sinais de inflamação gengival ou formação de bolsas durante o estudo, supôs-se que as células do periodonto poderiam elevar a produção destas MMPs e esta alta expressão refletiria a atividade remodeladora do LP sob forças ortodônticas.

Bildt et al. (2009) investigaram diferenças nos níveis de MMPs latentes e ativas e de TIMPs no FG nos lados de pressão e tensão de dentes movimentados ortodonticamente, comparando-os a dentes controle. Amostras de FG foram coletadas de oito pacientes com idades entre 10 e 18 anos que utilizavam aparelhagem fixa com molas de níquel-titânio que forneciam forças de 150 centinewtons (cN). As análises foram feitas com zimografia para avaliar MMPs ativas e latentes, confirmadas com *western blotting* e zimografia reversa para avaliar as TIMPs. Os resultados mostraram um aumento na MMP-2 ativa e pró MMP-2 nos lados experimentais quando comparados aos controles; um maior número de gelatinases no lado pressão do que no lado tensão e presença de maiores níveis de MMP-1 ativada nos lados de pressão e tensão quando comparados ao controle, no entanto em maiores níveis no lado tensão.

Kyrkanides, O'banion e Subtelny (2000) investigaram, *in vitro*, os efeitos da indometacina na atividade da colagenase e a síntese de pró-colágeno em culturas de células endoteliais de ratos. A degradação de colágeno mediada por MMPs foi avaliada a partir da mensuração por RT-PCR (reação em cadeia da polimerase transcriptase) dos níveis de RNAm pela MMP-2 e MMP-9 após 4, 24, 48 e 72 horas do início do tratamento. Os resultados mostraram que a inibição da ciclooxigenase resultou em exacerbação da produção e atividade da MMP-9 mediada por interleucina 1 β (IL-1 β), bem como da atividade de colagenase, acompanhada pela redução da síntese de pró-colágeno tipo IV pelas células endoteliais após quatro horas do início do tratamento. A administração de antiinflamatório resultou em exacerbação da atividade de gelatinase (MMP-2 e MMP-9). Devido ao fato de a remodelação do colágeno ser o resultado do balanço entre síntese e destruição, estes achados indicaram que a inibição da atividade de ciclooxigenase poderia potencialmente induzir a uma alteração

vascular e remodelação extracelular, afetando o movimento dentário ortodôntico. Portanto, a utilização de medicamentos antiinflamatórios poderia alterar as vias bioquímicas que mediam a remodelação da matriz extracelular, necessária para que ocorra a movimentação dentária (KYRKANIDES; O'BANION; SUBTELNY, 2000).

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo tem como proposta avaliar, em diferentes intervalos de tempo, os níveis de metaloproteinases da matriz no fluido gengival de caninos superiores submetidos ao movimento de distalização. Tendo como objetivos específicos:

- 1) quantificar as alterações no volume do fluido gengival;
- 2) detectar a presença das metaloproteinases da matriz MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-12 e MMP-13;
- 3) quantificar os níveis das metaloproteinases da matriz MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-12 e MMP-13;
- 4) avaliar se existem diferenças nos níveis de expressão entre as diferentes metaloproteinases da matriz observadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção de pacientes

Participaram deste estudo 16 pacientes da clínica do curso de especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, sendo 7 do sexo feminino e 9 do sexo masculino. A faixa etária do grupo amostral variou de 13 a 27 anos, com média das idades de 17,7 anos.

A seleção dos pacientes não obedeceu a critérios relacionados à idade, sexo, raça ou classificação de maloclusões, no entanto todos tinham indicação de extração dos primeiros pré-molares superiores como parte do planejamento do tratamento ortodôntico. Os critérios de exclusão foram: doenças auto-imunes, gravidez, lactação, utilização de medicamentos de uso prolongado nos seis meses anteriores ao início do estudo como, por exemplo, antibióticos, anti-histamínicos, cortisona, hormônios e qualquer outro medicamento que pudesse interferir no processo inflamatório ou que pudesse ter efeito adverso direto no periodonto.

Estes pacientes foram informados das características e dos objetivos do presente trabalho e assinaram um termo de consentimento pós-informado (APÊNDICE A) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob número 1948-CEP/HUPE (ANEXO A). Foi salientado que a coleta de fluido gengival seria rápida, indolor, não invasiva e de participação voluntária.

3.2 Controle periodontal

Após a montagem do aparelho, cada paciente recebeu no início da pesquisa (sete dias antes da introdução da força ortodôntica) instruções de higiene oral. Um exame clínico realizado por um periodontista autorizava a participação do paciente no projeto diante da inexistência de gengivite e demais doenças periodontais. As orientações dadas objetivaram ensinar ao paciente a técnica correta de escovação e utilização de fio dental e enxaguatórios bucais. Foram distribuídos kits contendo uma escova ortodôntica (Oral-B, São Paulo, Brasil), um tubo de dentifrício (Colgate/Palmolive, São Bernardo do Campo, Brasil) e um frasco de

enxaguatório bucal (gluconato de clorexidina a 0,12% - Noplak, Laboratório Daudt, Rio de Janeiro, Brasil) que deveria ser utilizado duas vezes ao dia até o fim da pesquisa, ou seja, durante quatro semanas.

Em cada dia de coleta de FG, um monitoramento clínico era feito através de dois exames: (1) Índice de placa visível (IPV) e; (2) Índice de sangramento gengival (ISG). A avaliação foi feita utilizando índices dicotômicos baseados na presença ou ausência de placa ou sangramento, sem gradação entre elas. Quando identificadas, era feita uma marcação em um quadro de monitoramento diário, que revelava ao fim de cada coleta o percentual de placa e sangramento.

As medidas de IPV e ISG foram determinadas com uma sonda periodontal manual do tipo Goldman-Fox/Williams (Hu-Friedy, Chicago, EUA). O examinador dividiu a arcada superior em dois quadrantes, analisando-os individualmente. As faces vestibular, lingual, mesial e distal dos dentes foram avaliadas em todas as consultas durante a realização do estudo.

3.3 Dispositivo Ortodôntico

Os primeiros pré-molares foram extraídos com no mínimo duas semanas de antecedência ao tempo -7d. Os pacientes foram orientados a não utilizar antiinflamatórios durante o período do estudo.

A arcada superior de cada paciente foi dividida em um lado teste, com introdução de força ortodôntica (Figura 1) e um lado controle, sem aplicação de força (Figura 2). Essa escolha foi feita de forma aleatória, apenas no período do estudo. Após o experimento, o tratamento continuou com a aplicação de força em ambos os lados.



Figura 1 – Lado teste: com aplicação de força ortodôntica através da colocação de mola de níquel-titânio ativa.



Figura 2 – Lado controle: sem aplicação de força, com dispositivo semelhante ao do lado teste, porém sem a mola de níquel-titânio.

Foram confeccionados e cimentados anéis nos primeiros molares superiores com tubos tripos 0.055” / 0.022” x 0.028”/ 0.22”x 0.028” (Morelli, Sorocaba, Brasil) soldados por vestibular e tubos duplos 2 x 0.036” (Morelli, Sorocaba, Brasil) por palatina. O recurso auxiliar de ancoragem foi feito com barra transpalatina conectando os primeiros molares superiores, com fio de calibre 0.032” e alça voltada para mesial (Morelli, Sorocaba, Brasil).

Nos caninos e segundos pré-molares foram colados bráquetes 0.022” x 0.030” (Morelli, Sorocaba, Brasil).

Um fio de estabilização de aço 0.019” x 0.025” (Morelli, Sorocaba, Brasil) passivo foi amarrado no tubo vestibular dos primeiros molares e bráquetes dos segundos pré-molares superiores. Foi confeccionado um arco segmentado 0.017”x 0.025” com fio TMA (Morelli, Sorocaba, Brasil) com alça vertical (de 5 a 7 mm de altura) e gancho “ponta bola” soldado antes de um “V bend” também confeccionado no arco. Apenas no lado teste a alça vertical foi ativada por uma mola de níquel-titânio (Morelli, Sorocaba, Brasil) para promover a distalização dos caninos. A força gerada foi de 150g medida por um tensiômetro (Dentaurum, Ispringen, Alemanha). A metodologia da mecânica ortodôntica empregada foi descrita previamente por Iwasaki et al. (2005).

3.4 Monitoramento imunológico

3.4.1 Coleta de amostras de fluido gengival

Foram coletadas amostras das faces mesial (tensão) e distal (pressão) dos caninos superiores de cada paciente em sete intervalos de tempo. A primeira coleta foi feita sete dias antes do início da aplicação da força ortodôntica, chamado tempo -7d. A segunda coleta no dia da aplicação da força, chamado tempo 0h. A terceira, uma hora após a aplicação da força, chamado tempo 1h. A quarta, vinte e quatro horas após a aplicação da força, chamado tempo 24h. A quinta, uma semana após a aplicação da força, chamado tempo 7d. A sexta, duas semanas após a aplicação da força, chamado tempo 14d. E a sétima, três semanas após a aplicação da força, chamado tempo 21d.

A coleta das amostras foi realizada após o isolamento com roletes de algodão e jatos de ar da área a ser coletada. Uma tira de papel absorvente padrão (Periopaper[®], IDE Interstate, Amityville, EUA) foi introduzida no sulco gengival até encontrar resistência, permanecendo nesta posição por trinta segundos (Figura 3). Em seguida, a tira era retirada e posicionada no medidor de fluido gengival previamente calibrado (Periotron 8000[®], IDE Interstate, Amityville, EUA).



Figura 3 – Coleta do fluido gengival: tira de papel absorvente em posição.

Após a medição, cada tira de papel absorvente foi armazenada separadamente em tubos plásticos próprios (Eppendorf®). Ao final da coleta, os tubos plásticos foram estocados em um freezer sob temperatura de -20° . Após o término do período do estudo todas as amostras foram enviadas para o *Forsyth Institute*, Boston, EUA, onde permaneceram armazenadas à temperatura de -70° C até a data da análise.

3.4.2 Multianálise imunoenzimática com microesferas

A metodologia da multianálise imunoenzimática consiste na utilização de conjuntos de microesferas (*beads*) que têm adicionados anticorpos de captura para análises individuais. No presente estudo foi utilizado o kit *Fluorokine® MultiAnalyte Profiling* (R&D Systems, Minneapolis, EUA) que consiste em um kit multiplex para identificação e quantificação de MMPs em humanos com alvo de avaliação nas MMPs -1, -2, -3, -7, -8, -12 e -13.

Foram utilizadas placas de filtração e ensaio de 96 poços (R&D Systems, Minneapolis, EUA) que foram preparadas da seguinte forma, de acordo com as normas do fabricante:

- 1) pré-lavagem dos poços designados para análise. Um volume de 0,2 ml da solução de lavagem foi adicionado aos poços da placa de exame. Após 30 segundos foi feita a aspiração com sugador a vácuo;

- 2) a solução contendo as *beads* foi posta em um vibrador por 30 segundos e em seguida em um aparelho de ultra-som por mais 30 segundos;
- 3) foram adicionados 100 μl da solução de lavagem a cada poço e após 15 a 30 segundos de impregnação das *beads*, a solução de lavagem foi aspirada com o sugador a vácuo. Esta etapa foi repetida mais uma vez e o filtro da parte inferior da placa foi seco com papel toalha para remover líquidos residuais;
- 4) nos poços designados para confecção da curva padrão (primeira coluna da placa de 96 poços) foram adicionados 50 μl da diluição padrão proveniente do *kit* de análise;
- 5) nos poços designados para análise foram adicionados 50 μl de cada uma das amostras em seu respectivo poço;
- 6) foram adicionados 50 μl da solução contendo as micropartículas (*beads*) em cada poço da placa de ensaio.
- 7) após estas etapas a placa foi recoberta com folha de alumínio, para minimizar a exposição à luz e incubada por duas horas em temperatura ambiente em um agitador horizontal a 500 ± 50 rotações por minuto (rpm). A velocidade de mistura deveria ser suficiente para manter as *beads* suspensas durante a incubação;
- 8) após as 2 horas de incubação, o líquido dos poços foi removido por aspiração a vácuo.
- 9) foram adicionados 100 μl da solução de lavagem, e após 30 segundos de contato com as *beads*, foram aspirados com o sugador a vácuo. Esta etapa foi repetida mais duas vezes.
- 10) foram adicionados em cada poço 50 μl de uma solução contendo o anticorpo de detecção biotilado e a placa recoberta com papel alumínio e colocada para incubar por 1 hora, à temperatura ambiente, em um agitador horizontal a 500 ± 50 rpm;
- 11) após 1 hora de incubação, o líquido dos poços foi removido por aspiração a vácuo e a placa lavada três vezes com 100 μl por poço de solução de lavagem.
- 12) foram adicionados 50 μl de uma solução de estreptavidina conjugada a uma proteína fluorescente, R-ficoeritrina (estreptavidina-RPE);

- 13) a placa foi novamente recoberta com papel alumínio e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente em um agitador horizontal a 500 ± 50 rpm;
- 14) após a incubação o líquido dos poços foi removido por aspiração a vácuo e a placa lavada três vezes com 100 μ l por poço de solução de lavagem.
- 15) foram adicionados 100 μ l da solução de lavagem em cada poço. A placa foi colocada no agitador horizontal por 2 minutos a 500 ± 50 rpm, para ressuspender as *beads* e em seguida a placa foi levada para análise no Luminex 100[®] (Luminex Corporate, Austin, EUA).

3.4.3 Luminex 100[®]

Uma vez inserida na plataforma de encaixe da placa de 96 poços do Luminex 100[®], o processo de leitura é realizado através de dois feixes de *lasers*. Um primeiro feixe de *laser* identifica as propriedades espectrais das *beads*, permitindo a identificação e o monitoramento simultâneo de até 100 alvos diferentes. O segundo *laser* excita as R-ficoeritrinas presentes nas superfícies das *beads* e a intensidade da fluorescência é medida e apresentada em um computador acoplado ao Luminex 100[®] usando um software específico (MasterPlex[®] CT v1.0, MiraiBio, São Francisco, EUA). Cerca de 100 *beads* por alvo foram analisadas e a mediana da intensidade de fluorescência reportada. As medidas de fluorescência para a curva padrão foram plotadas contra as concentrações dos diversos mediadores e regressão linear utilizada quando necessária para calcular a concentração das amostras de FG. Todas as medidas de fluorescência obtidas em cada poço foram transformadas em uma mesma unidade, picograma/sítio (pg/sítio) já que as concentrações, em pg/ μ l, fornecidas pela empresa produtora do kit utilizado (R&D Systems, Minneapolis, EUA) são diferentes para cada MMP de acordo com os padrões.

3.5 Análise estatística

Os dados clínicos de IPV e ISG foram obtidos a partir da análise individual dos dois quadrantes superiores. Os índices foram submetidos à análise estatística a partir de suas medianas. O teste de normalidade D'Agostino revelou que a amostra apresentava uma distribuição não normal em alguns grupos, sendo indicada uma estatística não paramétrica para esses dados. Utilizou-se então a análise de variância de Friedman.

Em relação ao volume de FG e os níveis de concentração das MMPs os grupos foram comparados individualmente por face ao longo do tempo e entre si em cada tempo. A avaliação dos dados das MMPs no FG foi realizada a partir das medianas obtidas para cada variável. Para comparar cada MMP no FG nos grupos controle-tensão (CT) *versus* teste-tensão (TT) e controle-pressão (CP) *versus* teste-pressão (TP) utilizou-se o teste de Wilcoxon por se tratar de uma amostra pareada com distribuição não normal. O teste de Wilcoxon também foi utilizado para comparar as alterações das MMPs em cada tempo individualmente nos diferentes grupos e para comparar os lados tensão e pressão dentro de cada grupo. As comparações ao longo do tempo foram realizadas a partir do teste de Friedman associado ao teste de Dunn para comparações múltiplas.

A avaliação dos dados de volume de FG foi realizada a partir das médias obtidas para cada variável. A análise de normalidade da distribuição dos dados foi examinada pelo teste D'Agostino com 95% de confiança, revelando que a amostra apresentava distribuição normal. As comparações ao longo do tempo foram realizadas através do teste de análise de variância (ANOVA) associado ao teste de Dunnett para comparar os diferentes pares de tempo.

Todas as análises foram realizadas com 95% de confiança ou $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Clínicos

Apesar das diferenças quanto às posições iniciais dos caninos superiores, em todos os pacientes da amostra um movimento de distalização, com magnitudes diferenciadas, foi observado no lado teste. No lado controle, por sua vez, não foi constatado nenhum tipo de movimentação.

4.2 Periodontais

Durante o período do estudo e coleta do FG, todos os 16 pacientes mantiveram boa higiene oral. Todos os sítios tanto do lado controle quanto do teste apresentaram boa saúde gengival e periodontal sem sinais clínicos de inflamação.

O Gráfico 1 mostra o comportamento dos IPV e ISG através de suas medianas durante o período do estudo.

Os resultados indicam uma redução de ambos os índices durante o período do experimento, sendo mais expressivo em relação ao IPV ($p=0,0064$). Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os tempos -7d e 7d; e entre -7d e 14d (Tabela 1). Isso estaria, provavelmente, associado à melhora da escovação e motivação por parte dos pacientes após as instruções de higiene bucal e principalmente pelo uso de gluconato de clorexidina. Houve uma redução de -7d para 0h, no entanto esta não se mostrou estatisticamente significativa. Após um período maior de avaliação foi possível observar a redução do IPV quando comparado o tempo -7d em relação aos tempos 7d e 14d.

Em relação ao ISG, observou-se uma redução entre os tempos -7d e 0h. Isso poderia estar relacionado à melhora dos padrões de higiene. No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,507$).

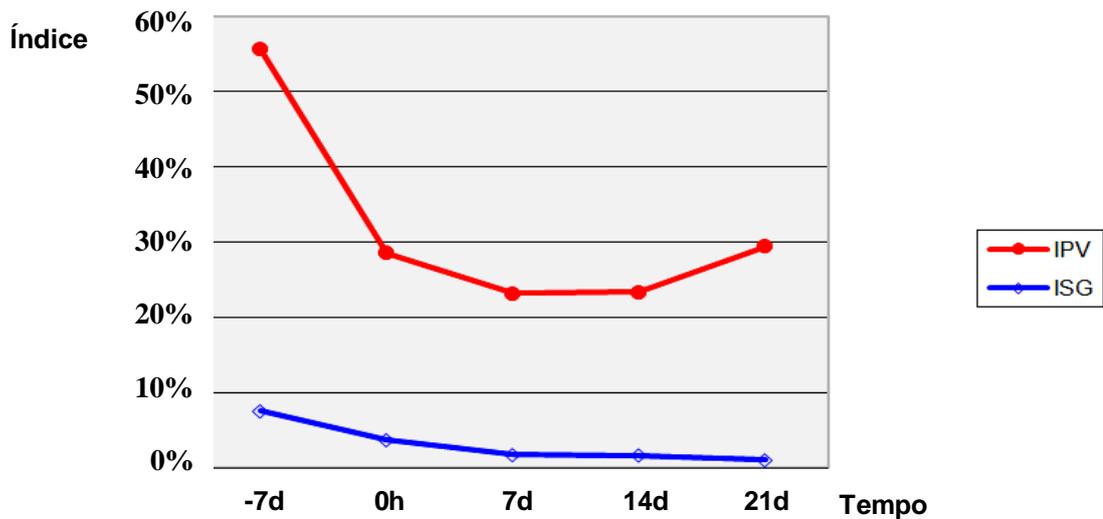


Gráfico 1 – Índices de placa visível e de sangramento gengival ao longo do tempo.

Tabela 1 – Medianas (MDN) e desvios-padrão (DP) dos IPV e ISG ao longo do tempo. São apresentados também os valores de P de Friedman e as diferenças inter-tempos.

Tempos	-7d		0h		7d		14d		21d		Valor P Friedman	Diferenças Inter-tempos
	MDN	DP										
Placa	0,50	0,30	0,29	0,19	0,17	0,25	0,30	0,20	0,29	0,21	0,0064	-7d x 7d*/ -7d x 14d*
Sangramento	0,0	0,17	0,00	0,07	0,00	0,07	0,00	0,05	0,00	0,02	0,5070	ns

4.3 Metaloproteinases da matriz

A análise com Luminex mostrou-se eficiente na identificação e determinação dos níveis de todas as MMPs avaliadas.

A Tabela 2 apresenta as medianas (MDN) e distâncias interquartílicas (DI) dos níveis de cada uma das MMPs no lado controle-tensão (CT). Observou-se alteração estatisticamente significativa ao longo do tempo apenas para MMP-1 ($p=0,015$) entretanto a análise estatística post-hoc não teve poder para identificar diferenças entre tempos específicos.

Tabela 2 – Medianas (MDN), distâncias interquartílicas (DI) e análise estatística com valores de P de Friedman avaliando cada MMP testada ao longo do tempo no lado CT.

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS – LADO CONTROLE-TENSÃO																
	-7d		0h		1h		24h		7d		14d		21d		Valor P Friedman	Análise Post-hoc
	MDN	DI	MDN	DI	MDN	DI	MDN	DI	MDN	DI	MDN	DI	MDN	DI		
MMP-1	2,35	29,25	3,80	42,80	2,40	10,68	10,00	94,75	1,90	28,00	2,30	28,51	5,70	4,88	0,015*	----
MMP-2	26,55	40,08	39,20	26,47	24,20	26,78	27,40	26,55	28,00	33,38	38,40	27,35	31,50	25,65	0,469	----
MMP-3	4,60	9,28	2,35	15,70	1,45	8,98	10,60	17,53	1,20	2,48	3,80	6,30	2,40	8,15	0,063	----
MMP-7	13,35	17,43	9,30	15,55	9,40	14,40	11,70	16,18	11,70	14,03	11,30	16,40	9,60	17,83	0,468	----
MMP-8	1841,80	5096,70	1269,95	2944,50	929,25	3872,30	1291,50	2654,30	692,00	4346,10	1349,50	3242,90	1019,00	3531,07	0,279	----
MMP-12	12,00	10,86	11,95	18,51	8,05	14,08	14,80	13,00	11,10	20,33	14,00	23,88	13,30	26,46	0,063	----
MMP-13	0,00	2,35	0,00	9,08	0,00	10,98	0,00	8,30	2,80	9,93	0,00	10,68	1,80	10,33	0,879	----

* Estatisticamente significativo

Na Tabela 3 podem ser observadas as MDN e DI dos níveis de cada uma das MMPs no lado controle-pressão (CP). Os resultados revelam uma diferença no conjunto dos dados de MMP-1 ($p= 0,001$) e MMP-3 ($p= 0,012$), sendo estatisticamente significativa apenas entre os tempos 24h e 7d; e 7d e 21d nos dois grupos.

Na Tabela 4 podem ser observadas as MDN e DI dos níveis de cada uma das MMPs no lado teste-tensão (TT). Os resultados mostraram uma diferença estatisticamente significativa para MMP-3 ($p= 0,001$). A análise de Dunn demonstrou que estas diferenças estavam localizadas entre os tempos 24h e 7d; 7d e 14d; e 7d e 21d.

Na Tabela 5 podem ser observadas as MDN e DI dos níveis de cada uma das MMPs no lado teste-pressão (TP). Os resultados mostraram uma diferença estatisticamente significativa para MMP-1 ($p= 0,002$) e MMP-3 ($p= 0,008$). A análise de Dunn demonstrou que estas diferenças estavam localizadas entre os tempos 24h e 7d para MMP-1 e 7d e 14d para MMP-3.

Foram avaliadas, ainda, as diferenças intergrupos (TT, TP, CT e CP) em cada tempo. Estas comparações não mostraram resultados estatisticamente significativos. Da mesma forma as comparações entre os lados pressão e tensão para cada tempo individualmente não demonstraram resultados estatisticamente significativos.

Os Gráficos 2 e 3 (folhas 49 e 50) representam as flutuações dos níveis do volume do fluido gengival e concentrações das MMPs avaliadas nos lados de pressão e tensão, controle e teste em todos os períodos de tempo avaliados.

Tabela 3 – Medianas (MDN), distâncias interquartílicas (DI) e análise estatística com valores de P de Friedman avaliando cada MMP testada ao longo do tempo no lado CP.

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS – LADO CONTROLE-PRESSÃO																
	-7d		0h		1h		24h		7d		14d		21d		Valor P Friedman	Análise Post-hoc
	MDN	DI	MDN	DI	MDN	DI	MDN	DI	MDN	DI	MDN	DI	MDN	DI		
MMP-1	4,35	32,08	6,85	107,28	3,60	14,23	13,80	163,05	3,20	41,61	2,80	34,15	4,30	4,50	0,001*	24h x 7d; 7d x 21d
MMP-2	43,85	44,87	41,20	39,32	46,55	54,77	49,50	45,00	38,70	32,78	37,30	31,23	47,00	55,70	0,850	----
MMP-3	3,40	4,80	2,85	22,86	2,60	7,25	17,40	43,38	2,00	6,43	3,40	10,05	1,20	12,30	0,012*	24h x 7d; 7d x 21d
MMP-7	12,85	17,48	12,20	14,53	12,30	18,15	11,30	16,90	12,60	18,15	11,70	16,03	12,40	20,95	0,975	----
MMP-8	1449,75	3403,20	924,80	2438,90	1417,25	2319,80	967,00	1794,70	489,10	2000,80	1439,40	1564,30	1107,00	2471,60	0,152	----
MMP-12	16,65	23,36	11,10	16,86	8,15	7,43	19,70	18,83	19,20	25,65	15,90	13,63	10,30	19,53	0,170	----
MMP-13	0,00	5,53	0,05	10,20	0,00	8,95	2,20	17,98	9,20	24,61	0,30	13,48	13,50	19,55	0,335	----

* Estatisticamente significativo

Tabela 4 – Medianas (MDN), distâncias interquartílicas (DI) e análise estatística com valores de P de Friedman avaliando cada MMP testada ao longo do tempo no lado TT.

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS – LADO TESTE-TENSÃO																
	-7d		0h		1h		24h		7d		14d		21d		Valor P Friedman	Análise Post-hoc
	MDN	DI														
MMP-1	2,70	6,75	2,20	5,63	2,50	18,78	4,30	42,83	1,95	11,91	3,30	10,30	3,95	6,63	0,110	----
MMP-2	32,65	36,32	29,00	39,62	24,70	36,23	33,20	31,62	26,15	35,93	39,50	30,10	30,00	32,52	0,330	----
MMP-3	3,30	3,88	2,40	5,45	2,25	4,03	5,70	20,18	1,55	2,60	2,00	5,60	2,15	6,93	0,001*	24h x 7d; 7d x 14d; 7d x 21d
MMP-7	11,50	18,08	10,85	17,18	7,65	16,03	9,95	12,73	12,55	16,10	6,60	13,75	4,45	14,93	0,127	----
MMP-8	1554,20	4061,30	1890,95	2877,60	1097,30	4808,90	1052,00	2155,90	1640,35	3579,90	1525,95	2631,00	1143,00	2268,00	0,288	----
MMP-12	14,25	13,68	10,50	24,33	10,45	13,45	17,55	28,58	14,15	32,96	17,60	19,73	12,05	24,33	0,181	----
MMP-13	0,00	9,15	0,00	9,38	0,00	0,38	0,00	9,28	0,00	10,73	0,00	15,50	0,55	13,03	0,434	----

* Estatisticamente significativo

Tabela 5 – Medianas (MDN), distâncias interquartílicas (DI) e análise estatística com valores de P de Friedman avaliando cada MMP testada ao longo do tempo no lado TP.

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS - LADO TESTE-PRESSÃO																
	-7d		0h		1h		24h		7d		14d		21d		Valor P Friedman	Análise Post-hoc
	MDN	DI														
MMP-1	3,50	30,86	2,25	45,68	1,90	22,06	5,60	45,86	2,15	25,18	2,95	23,71	2,25	9,50	0,002*	24h x 7d
MMP-2	36,55	47,53	28,35	37,68	29,60	28,57	37,60	40,97	25,45	20,30	33,25	22,20	34,40	33,35	0,059	----
MMP-3	3,00	15,98	2,70	12,40	1,80	5,38	9,10	34,06	1,20	2,90	2,85	6,25	2,60	6,68	0,008*	7d x 14d
MMP-7	13,10	18,38	12,10	18,08	11,75	17,18	11,50	21,40	4,80	15,43	10,65	19,88	12,20	16,95	0,223	----
MMP-8	1315,50	2124,60	1161,50	2278,60	1211,10	3796,70	1068,00	1630,80	1031,45	2077,50	1588,05	5907,70	1851,00	3026,10	0,521	----
MMP-12	9,65	18,06	9,65	19,58	8,50	12,86	19,75	31,11	7,35	12,50	10,60	12,83	9,80	16,00	0,033*	----
MMP-13	0,00	17,48	0,00	2,58	0,00	0,00	0,00	14,15	2,00	12,63	0,00	25,23	0,55	16,50	0,467	----

* Estatisticamente significativo

Lado de Tensão

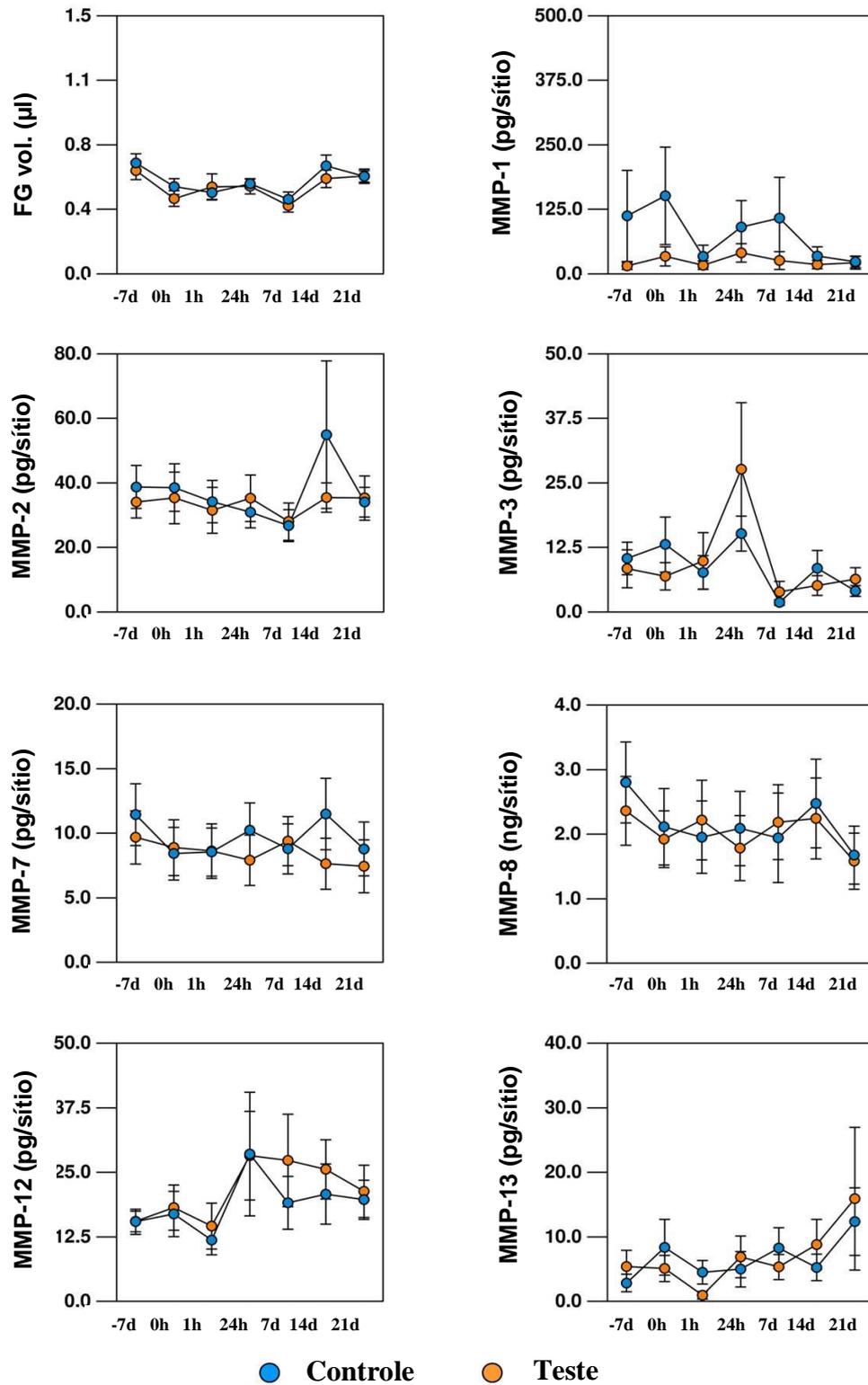


Gráfico 2 – Flutuações dos níveis de FG e das MMPs -1, -2, -3, -7, -8, 12 e -13 (pg/sítio) durante os diferentes intervalos de tempo da movimentação ortodôntica no lado tensão, comparando-se os lados controle e teste.

Lado de Pressão

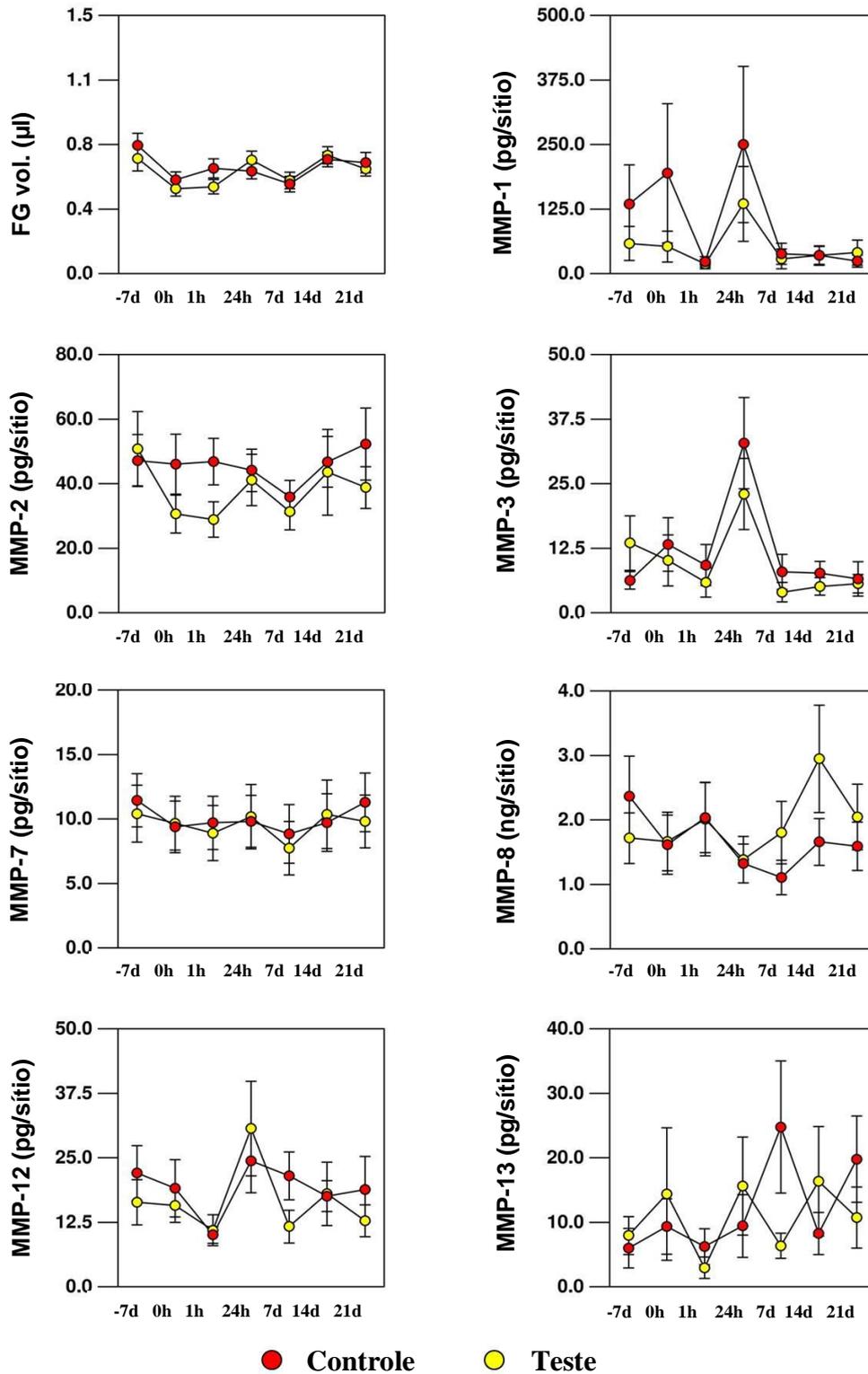


Gráfico 3 – Flutuações dos níveis de FG e das MMPs -1, -2, -3, -7, -8, 12 e -13 (pg/sítio) durante os diferentes intervalos de tempo da movimentação ortodôntica no lado pressão, comparando-se os lados controle e teste.

4.4 Fluido gengival

O Gráfico 4 representa as médias do volume do fluido gengival em μl na face distal (tensão) nos lados controle e teste. Observa-se no gráfico, em todos os grupos experimentais, uma redução nos níveis iniciais do fluido gengival. No lado controle, observaram-se flutuações no volume do FG ao longo do tempo ($p= 0,0193$) entretanto a análise estatística entre cada tempo não teve poder para identificar diferenças entre períodos específicos. No lado teste os resultados revelam uma diferença no conjunto dos dados ($p= 0,0109$), sendo estatisticamente significativa apenas entre os tempos -7d e 0h . Estes resultados podem ser observados na Tabela 6 (folha 53).

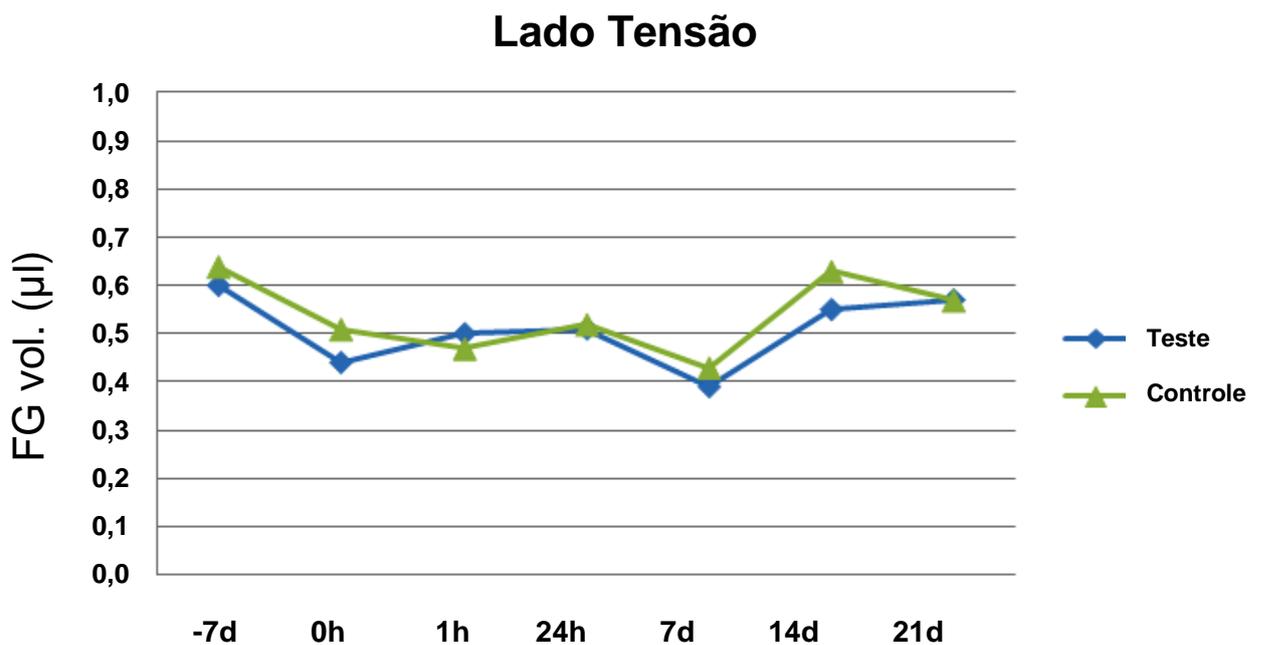


Gráfico 4 – Alterações do volume do fluido gengival no lado de tensão nos lados controle e teste a partir de suas médias.

O Gráfico 5 revela as médias do volume do fluido gengival em μl na face mesial (pressão) nos lados controle e teste. No lado controle, observam-se flutuações no volume do FG ao longo do tempo ($p= 0,0361$). Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre os intervalos de tempo -7d e 0h. O lado teste apresentou uma diferença no conjunto dos dados ($p=0,006$) com diferenças estatisticamente significativas entre os tempos -7d e 0h; e 0h e 14d.

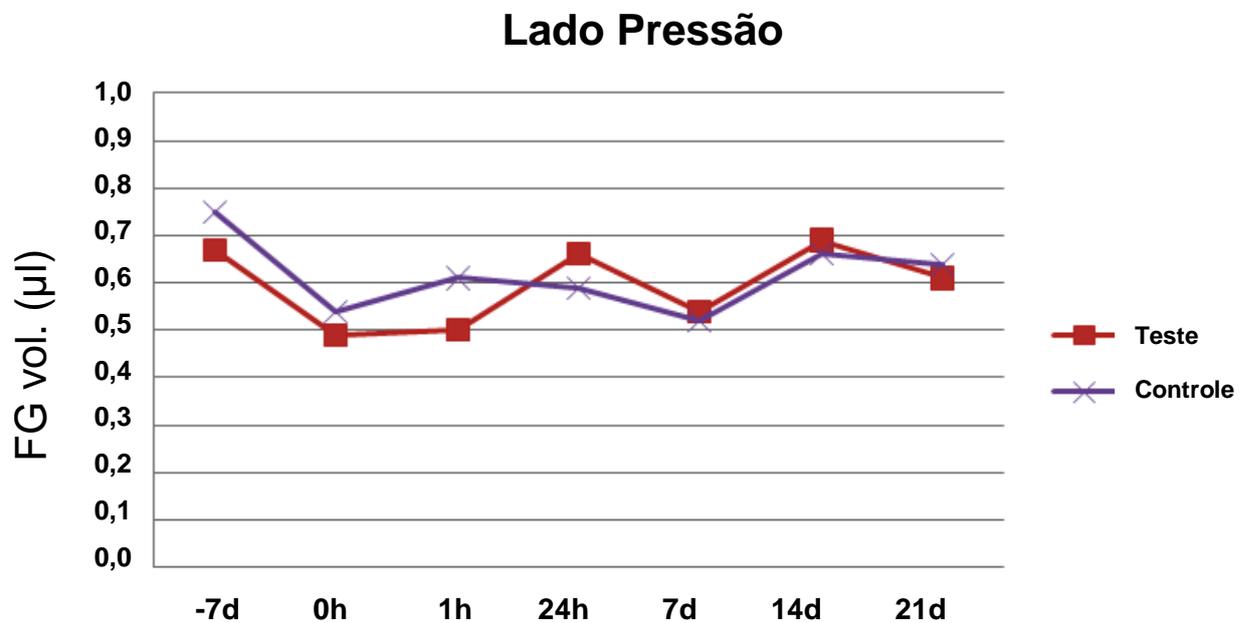


Gráfico 5 – Alterações do volume do fluido gengival no lado de pressão nos lados controle e teste a partir de suas médias.

Tabela 6 – Médias (MED) e desvios-padrão (DP) do volume do fluido gengival em μl nos lados controle e teste nas áreas de pressão e tensão ao longo do tempo. São apresentados também os valores de P de ANOVA e as diferenças inter-tempos para as comparações inter-grupos.

		VOLUME DE FLUIDO GENGIVAL														Valor P ANOVA	Diferenças Inter-tempos
		-7d		0h		1h		24h		7d		14d		21d			
		MED	DP	MED	DP	MED	DP	MED	DP	MED	DP	MED	DP	MED	DP		
Controle	Tensão	0,64	0,21	0,51	0,18	0,47	0,16	0,52	0,11	0,43	0,16	0,63	0,24	0,57	0,13	0,0193*	----
	Pressão	0,75	0,28	0,54	0,19	0,61	0,22	0,59	0,17	0,52	0,17	0,66	0,16	0,64	0,23	0,0361*	-7d x 0h
Teste	Tensão	0,60	0,21	0,44	0,18	0,50	0,31	0,51	0,18	0,39	0,15	0,55	0,20	0,57	0,16	0,0109*	-7d x 0h
	Pressão	0,67	0,29	0,49	0,17	0,50	0,16	0,66	0,21	0,54	0,19	0,69	0,20	0,61	0,16	0,006*	-7d x 0h; 0h x 14d

* Estatisticamente significativo

Foram avaliadas, ainda, as diferenças intergrupos (TT, TP, CT e CP) em cada tempo. Estas comparações não mostraram resultados estatisticamente significativos. Da mesma forma as comparações entre os lados pressão e tensão para cada tempo individualmente não foram significativas com exceção do lado teste nos tempos 7d ($p= 0,03776$) e 14d ($p= 0,02307$) nos quais foram observados níveis mais elevados de FG no lado pressão em relação ao tensão. No Gráfico 6 visualizam-se as alterações do FG de todos os grupos ao longo do tempo.

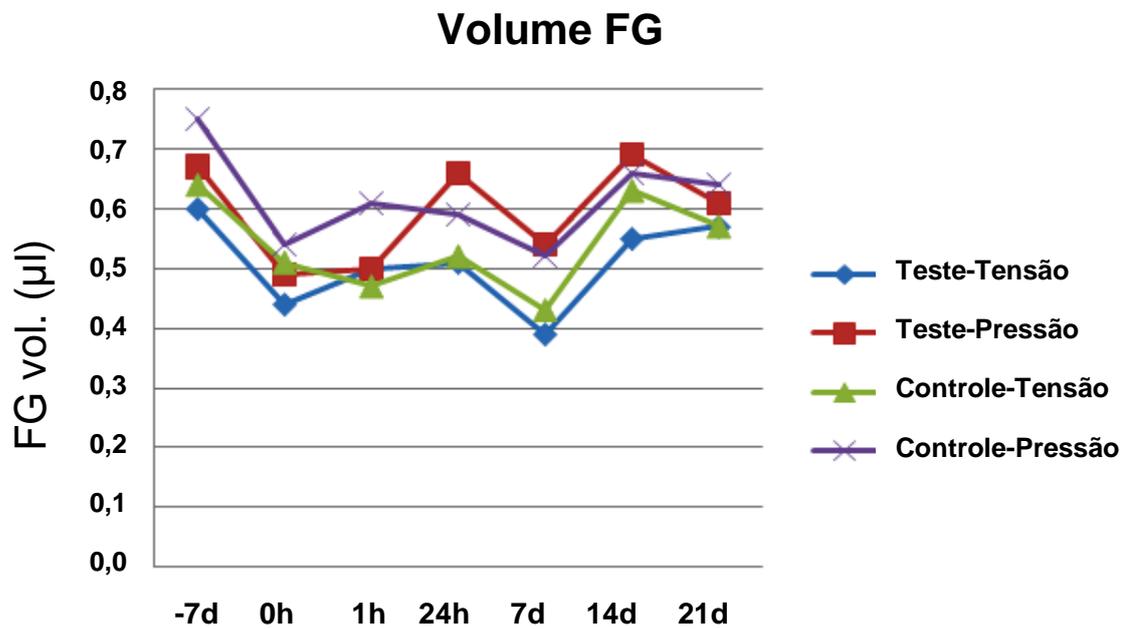


Gráfico 6 – Alterações do volume do fluido gengival nos lados controle/teste, tensão/pressão a partir de suas médias.

5 DISCUSSÃO

Estudos prévios sugeriram que o fluxo do fluido gengival reflete as mudanças dos tecidos periodontais mais profundos, como osso alveolar e ligamento periodontal, de dentes sob a ação do tratamento ortodôntico (GRIEVE et al., 1994; HEASMAN; MILLETT; CHAPPLE, 1996; IWASAKI et al., 2001; IWASAKI et al., 2005; TUNCER et al., 2005; KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006; MASELLA; MEISTER, 2006).

No presente estudo, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-12 e MMP-13 foram escolhidas por estarem envolvidas em diferentes fases da remodelação do colágeno e catalisarem a degradação inicial da maioria das matrizes proteicas extracelulares do LP. Estas proteases são, em conjunto, responsáveis pela degradação de todos os componentes da matriz extracelular, não apenas durante a remodelação do tecido conjuntivo, mas também em vários processos patológicos associados à destruição tecidual. As metaloproteinases da matriz avaliadas foram detectadas no fluido gengival e pôde ser observada a flutuação dos níveis destas MMPs durante o período de 28 dias do estudo sendo encontradas poucas alterações com significância estatística entre os tempos, lados controle/teste e lados pressão /tensão. As poucas variações encontradas concentraram-se nas MMPs -1 e -3 sendo em CT para MMP-1; CP para MMPs -1 e -3 entre os tempos 24h e 7d; e 7d e 21d para ambas MMPs, TT para MMP-3 entre os tempos 24h e 7d; 7d e 14d; e 7d e 21d e em TP para MMP-1 entre os tempos 24h e 7d e para MMP-3 entre os tempos 7d e 14d.

Foram avaliadas, ainda, as diferenças intergrupos (TT, TP, CT e CP) em cada tempo. Estas comparações não mostraram resultados estatisticamente significativos. Da mesma forma as comparações entre os lados pressão e tensão para cada tempo individualmente não demonstraram resultados significativos.

Observou-se que os níveis de MMP-8 apresentaram-se muito mais elevados que das outras MMPs testadas (Tabelas 2, 3, 4 e 5, folhas 44, 46, 47 e 48) porém, suas variações não se mostraram significativas ao longo do tempo, entre os lados controle/teste e pressão/tensão. Desta maneira, embora tenha sido encontrada expressão mais elevada em relação às outras MMPs não se pode sugerir que esta colagenase tenha atuação na remodelação periodontal durante a movimentação dentária ortodôntica.

Estes resultados podem ser confrontados com o estudo de Rescala (2005) que quantificou a presença de MMP-8 no FG de 20 pacientes com periodontite e 10 com gengivite. Os resultados mostraram que o grupo de pacientes com periodontite apresentou níveis de MMP-8 significativamente mais altos que pacientes com gengivite. A MMP-8 tem sido relatada como um potencial marcador para monitoração da condição periodontal, sendo uma das principais responsáveis pela quebra de colágeno durante a periodontite crônica. Outros estudos também relatam altos níveis de MMP-8 no FG de pacientes com periodontite (INGMAN et al., 1994; LEE et al., 1995; INGMAN et al., 1996). Estes dados associados aos resultados encontrados no presente estudo sugerem que aumento nos níveis de MMPs como a MMP-8 no FG pode estar mais relacionado às alterações periodontais inflamatórias do que com a movimentação ortodôntica.

Estudos *in vivo*, avaliando MMPs no FG relatam resultados contraditórios (REDLICH et al., 2001; APAJALAHTI; SORSA; INGMAN, 2003; INGMAN et al., 2005; CANTARELLA et al., 2006; BILDT et al., 2009; CAPELLI JÚNIOR et al., 2010). A incoerência nos resultados pode ser atribuída principalmente às diferentes condições experimentais, tais como a magnitude, duração e tipo de força empregada e da natureza complexa das condições *in vivo*, os quais podem influenciar as alterações fenotípicas causadas por forças mecânicas (REDLICH et al., 2001).

Apajalahti, Sorsa e Ingman (2003) observaram aumento significativo nos níveis de MMP-8 no FG de 4 a 8 horas após a aplicação da força, quando comparados a antes da aplicação e aos dentes controle, diferentemente dos resultados encontrados no presente estudo. Este aumento da MMP-8 está de acordo com o estudo piloto realizado por Ingman et al. (2005) que encontrou, ao avaliar pacientes diariamente durante 30 dias, níveis desta enzima, significativamente maiores nos pacientes ortodônticos em relação ao grupo controle. No entanto Bildt et al. (2009) não conseguiram identificar MMP-8 no FG. Diferenças nos métodos de avaliação, períodos de coleta e técnicas de análise podem explicar, em parte, as diferenças encontradas entre o presente estudo e outros relatados na literatura.

No presente trabalho os níveis de MMP-1 apresentaram-se ligeiramente aumentados em alguns tempos avaliados e os de MMP-2 constantes, o que contradiz resultados obtidos em outros estudos que observaram um aumento na MMP-2 e presença de maiores níveis de MMP-1 ativada nos lados de pressão e tensão quando comparados ao controle. Porém outros estudos que objetivavam avaliar as alterações da MMP-1 durante o movimento dentário inicial não foram capazes de detectar a presença desta MMP no fluido gengival (APAJALAHTI; SORSA; INGMAN, 2003; INGMAN et al., 2005).

Segundo Bildt et al. (2009), estas variações podem dever-se ao fato de que a MMP-1 parece aumentar durante o movimento dentário mais prolongado, enquanto a maioria dos estudos avalia as variações das MMPs em períodos mais curtos de tempo.

Estudos *in vitro* mostraram os mecanismos reguladores do RNAm da MMP-1 e MMP-2 e a produção destas proteínas sob estresse mecânico nos fibroblastos gengivais e periodontais de seres humanos (CARANO; SICILIANI, 1996; BOLCATO-BELLEMIN et al., 2000; REDLICH et al., 2001; NAHM et al., 2004). Além disso, foi demonstrado em um modelo *in vitro* de LP que fibroblastos de seres humanos podem perceber e responder de duas formas distintas de estímulo mecânico, forças tensionais e compressivas, à síntese ou degradação de matriz extracelular (HE et al., 2004).

As MMPs desempenham papel de grande importância na quebra de colágeno e matriz extracelular e remodelação do ligamento periodontal, importantes fatores para que a movimentação ortodôntica ocorra. Partindo deste princípio, os achados deste estudo com alterações pouco significativas nos níveis das MMPs, sugerem que estas enzimas são liberadas em quantidade suficiente para que o movimento dentário ocorra e sendo consumidas quase que integralmente pelos tecidos periodontais ao redor do dente movimentado, não havendo elevação significativa nos níveis no FG.

Considerando ainda que o volume e a composição do FG são diretamente influenciados pela inflamação gengival induzida por placa bacteriana (EGELBERG, 1966), os pacientes participantes da amostra deste estudo receberam orientações de higiene oral, utilizaram gluconato de clorexidina a 0,12% e foram acompanhados durante o período do estudo com o objetivo de minimizar o impacto de uma possível inflamação gengival nos resultados.

Estudos prévios mostraram que independentemente da existência de movimento dentário observado clinicamente, o volume de fluido gengival seria influenciado pela presença de aparelhagem ortodôntica sugerindo que a inflamação teria um maior efeito sobre o volume de FG do que a movimentação ortodôntica (PERINETTI et al., 2002; APAJALAHTI et al., 2003). Apajalahti et al., (2003), Ingman et al. (2005) e Perinetti et al. (2002) obtiveram resultados que mostraram que o fluxo do FG não foi alterado significativamente pelo tratamento ortodôntico. Estes achados corroboram os resultados encontrados no presente estudo, no qual não foram observadas diferenças significativas no volume de FG quando comparados os lados teste e controle. As flutuações de volume de FG encontradas no lado teste ao longo do tempo foram semelhantes ao lado de controle. No

entanto, nos intervalos de tempo entre -7d e 0h nos lados CP, TT e TP e entre 0h e 14d no lado TP foram observadas diferenças significativas.

Estas diferenças mostraram uma tendência de concentração quando comparados o tempo -7d em relação ao tempo 0h, coletado uma semana após as instruções de higiene oral e 14d. Isso se justifica pela alteração no padrão de higiene oral, visto que em -7d os pacientes apresentavam seus padrões próprios de higiene bucal. Neste tempo os valores de leitura do Periotron[®] mostraram achados clínicos indicativos de presença de inflamação suave no tecido gengival. Estes valores estiveram de acordo com estudo prévio que quantificou o volume de fluido gengival em pacientes portadores de gengivite (GOODSON, 2003).

Em contraste, Tuncer et al. (2005) demonstraram, em pacientes submetidos à movimentação ortodôntica, aumento do volume de FG no lado tensão 24 horas após o início da movimentação e no lado pressão na primeira hora com diminuição após 10 dias. Após 30 dias foi observado aumento em ambos os lados. Segundo os autores, estes resultados sugerem que o trauma mecânico seria o responsável pela resposta inflamatória precoce determinada pelos altos níveis de FG. Capelli Júnior et al. (2010) observou em pacientes ortodônticos submetidos ao movimento de distalização de caninos superiores alteração significativa do volume de FG ao longo do tempo nos lados de pressão e tensão. No entanto, estes achados devem ser analisados com cautela visto que a área do sulco gengival é única e contínua existindo a possibilidade de contaminação entre o fluido gengival presente nas áreas de pressão e tensão (CANTARELLA et al., 2006).

Samuels, Pender e Last (1993) afirmaram que ainda que nenhuma alteração na saúde gengival ocorra, o volume de FG pode aumentar significativamente durante a movimentação ortodôntica. Uma explicação para estas diferenças pode estar relacionada aos diferentes métodos de coleta de FG. Além do mais, em estudos *in vivo* é impossível separar os resultados que representam injúrias aos tecidos daquelas que representam resposta celular à força aplicada. Apenas em estudos *in vitro* esta diferenciação é possível (CANTARELLA et al., 2006).

É importante salientar que a variabilidade na resposta mecânica entre os pacientes é comum na prática ortodôntica. Estas razões podem incluir diferenças no LP e número de células do osso alveolar e genomas, incluindo os genes para proteínas sinalizadoras; números de glóbulos brancos, fatores de crescimento, e citocinas por medida volumétrica do tecido-sangue; densidade mineral do osso alveolar; e vascularização do LP e osso alveolar por medida volumétrica dos tecidos (MASELLA; MEISTER, 2006).

A análise de substâncias pró-inflamatórias no FG mostra-se uma boa opção para examinar alterações bioquímicas que ocorrem no ligamento periodontal durante a movimentação ortodôntica (CANTARELLA et al., 2006; BILDT et al., 2009; DILSIZ et al., 2010).

Até o presente momento, não existem na literatura trabalhos que avaliem sete diferentes MMPs no FG durante o movimento dentário ortodôntico. Análises das MMPs no movimento dentário ortodôntico podem contribuir para regimes de tratamentos mais previsíveis no futuro. Podem servir como um auxiliar de diagnóstico para prever a taxa de movimento dentário e eventual recidiva (BILDT et al., 2009).

O projeto ENCODE (ENCODE PROJECT CONSORTIUM, 2004) começou a identificar os elementos estruturais e funcionais do genoma humano. Esta e outras pesquisas poderão permitir no futuro a correlação do genótipo do paciente com a apresentação clínica e perfis de proteínas analisados laboratorialmente. Isso permitirá que ortodontistas possam identificar fatores biológicos que induzam ou inibam o movimento dentário ortodôntico e, talvez, um plano de intervenção molecular para maximizar a resposta ao tratamento. Se a expressão genética em tecidos submetidos à força mecânica apresentar padrões de alteração nas proteínas secretadas no sangue ou no FG, talvez estes meios possam servir como janelas para o diagnóstico e prognóstico e fontes de biomarcadores durante o tratamento ativo para avaliação da eficiência da mecânica empregada (ALHASHIMI et al., 2001; MASELLA; MEISTER, 2006).

6 CONCLUSÕES

A partir da metodologia aplicada e pelos resultados obtidos, é possível apresentar as seguintes conclusões:

- 1) foram observadas flutuações no volume do FG nos tempos analisados. Houve diferenças significativas apenas nos intervalos de tempo entre -7d e 0h nos lados CP, TT e TP. Em TP foi observado ainda aumento do volume entre os tempos 0h e 14d;
- 2) as metaloproteinases da matriz MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-12 e MMP-13 foram detectadas no FG nos lados controle/teste e lados pressão/ tensão, em todos os intervalos de tempo analisados;
- 3) as flutuações dos níveis das MMPs apresentaram poucas alterações significativas entre os tempos, lados controle/teste e lados pressão/ tensão. As poucas variações encontradas concentraram-se nas MMPs -1 e -3. As diferenças intergrupos (TT, TP, CT e CP) em cada tempo não mostraram resultados significativos assim como as comparações entre os lados pressão e tensão para cada tempo individualmente;
- 4) as níveis de expressão da MMP-8 apresentaram-se muito mais elevados que das outras MMPs avaliadas. No entanto, não foram observadas diferenças significativas no fluido gengival de dentes sob movimentação ortodôntica comparados aos dentes controle.

REFERÊNCIAS

- ALHASHIMI, N. et al. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.119, n. 3, p. 307-312, Mar. 2001.
- APAJALAHTI, S.; SORSA, T.; INGMAN, T. Matrix metalloproteinase -2, -8, -9, and -13 in gingival crevicular fluid of short root anomaly patients. *Eur J Orthod*, v.25, n. 4, p. 365-369, Aug. 2003.
- APAJALAHTI, S. et al. The in vivo levels of matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during initial orthodontic tooth movement. *J Dent Res*, v.82, n. 12, p. 1018-1022, Dec. 2003.
- BASARAN, G. et al. Interleukins 2, 6, and 8 levels in human gingival sulcus during orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.130, n. 1, p. 7 e1-6, July 2006.
- BERKOVITZ, B. K. The structure of the periodontal ligament: an update. *Eur J Orthod*, v.12, n. 1, p. 51-76, Feb. 1990.
- BICKEL, M.; CIMASONI, G.; ANDERSEN, E. Flow and albumin content of early (pre-inflammatory) gingival crevicular fluid from human subjects. *Arch Oral Biol*, v.30, n. 8, p. 599-602, 1985.
- BILDT, M. M. et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod*, v.31, n. 5, p. 529-535, Oct. 2009.
- BLACK, G. The fibers and glands of the peridental membrane. *Dental Cosmos*, v.41, p. 101-122, 1899 apud GRIFFITHS, G. S. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*, v.31, p. 32-42, 2003.
- BOLCATO-BELLEMIN, A. L. et al. Expression of mRNAs encoding for alpha and beta integrin subunits, MMPs, and TIMPs in stretched human periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Dent Res*, v.79, n. 9, p. 1712-1716, Sept. 2000.
- CANTARELLA, G. et al. Levels of matrix metalloproteinases 1 and 2 in human gingival crevicular fluid during initial tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.130, n. 5, p. 568.e511-568.e516, Nov. 2006.

CAPELLI JÚNIOR, J. *Alterações nos níveis de metaloproteinases da matriz e quimiocinas no fluido gengival durante o movimento dentário ortodôntico*. 2007. 73 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <http://www.bdt.d.uerj.br/tde_arquivos/10/TDE-2008-10-31T175900Z-377/Publico/Jonas%20Capelli%20Junior.pdf>. Acesso em: 05 set. 2009.

CAPELLI JÚNIOR, J. et al. Alteração no volume do fluido gengival durante a retração de caninos superiores. *Dental Press Journal of Orthodontics*, v.15, n. 2, p. 52-57, Mar./Abr. 2010.

CARANO, A.; SICILIANI, G. Effects of continuous and intermittent forces on human fibroblasts in vitro. *Eur J Orthod*, v.18, n. 1, p. 19-26, Feb. 1996.

DAVIDOVITCH, Z. Tooth movement. *Crit Rev Oral Biol Med*, v.2, n. 4, p. 411-450, 1991.

DILSIZ, A. et al. Leptin levels in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Angle Orthod*, v.80, n. 3, p. 504-508, May 2010.

DOLCE, C.; MALONE, J.; WHEELER, T. Current concepts in the biology of orthodontic. *Seminars in Orthodontics*, v.8, p. 6-12, 2002.

DUDIC, A. et al. Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides. *Eur J Oral Sci*, v.114, n. 5, p. 416-422, Oct. 2006.

EGELBERG, J. Permeability of the dento-gingival blood vessels. 1. Application of the vascular labelling method and gingival fluid measurements. *J Periodontal Res*, v.1, n. 3, p. 180-191, 1966.

ENCODE PROJECT CONSORTIUM. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science*, v.306, n. 5696, p. 636-640, 2004.

GOODSON, J. M. Gingival crevice fluid flow. *Periodontol 2000*, v.31, p. 43-54, 2003.

GRIEVE, W. G. et al. Prostaglandin E (PGE) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) levels in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.105, n. 4, p. 369-374, Apr. 1994.

GRIFFITHS, G. S. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*, v.31, p. 32-42, 2003.

HE, Y. et al. Compression and tension: differential effects on matrix accumulation by periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Connect Tissue Res*, v.45, n. 1, p. 28-39, 2004.

HEASMAN, P. A.; MILLETT, D. T.; CHAPPLE, I. L. *The periodontium and orthodontics in health and disease*. 1. ed. New York: Ed. Oxford University Press, 1996.

HUANG, J.; KING, G.; KAPILA, S. Biologic Mechanisms in Orthodontic Tooth Movement. In: NANDA, R. *Biomechanics and Esthetic Strategies in Clinical Orthodontics*. 1. ed. Philadelphia: Saunders, 2005. Cap. 2, p. 17-37.

INGMAN, T. et al. Matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a pilot study during 1 month of follow-up after fixed appliance activation. *Eur J Orthod*, v.27, n. 2, p. 202-207, Apr. 2005.

INGMAN, T. et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, v.23, n. 12, p. 1127-1132, Dec. 1996.

INGMAN, T. et al. Multiple forms of gelatinases/type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, v.21, n. 1, p. 26-31, Jan. 1994.

IWASAKI, L. R. et al. Human interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist secretion and velocity of tooth movement. *Arch Oral Biol*, v.46, n. 2, p. 185-189, Feb. 2001.

IWASAKI, L. R. et al. Tooth movement and cytokines in gingival crevicular fluid and whole blood in growing and adult subjects. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.128, n. 4, p. 483-491, Oct. 2005.

KAWASAKI, K. et al. Effects of aging on RANKL and OPG levels in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res*, v.9, n. 3, p. 137-142, Aug. 2006.

KEELING, S. D. et al. Serum and alveolar bone phosphatase changes reflect bone turnover during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.103, n. 4, p. 320-326, Apr. 1993.

KIILI, M. et al. Collagenase-2 (MMP-8) and collagenase-3 (MMP-13) in adult periodontitis: molecular forms and levels in gingival crevicular fluid and immunolocalisation in gingival tissue. *J Clin Periodontol*, v.29, n. 3, p. 224-232, Mar. 2002.

KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.129, n. 4, p. 469 e461-432, Apr. 2006.

- KUROL, J.; RONNERMAN, A.; HEYDEN, G. Long-term gingival conditions after orthodontic closure of extraction sites. Histological and histochemical studies. *Eur J Orthod*, v.4, n. 2, p. 87-92, May 1982.
- KYRKANIDES, S.; O'BANION, M. K.; SUBTELNY, J. D. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in orthodontic tooth movement: metalloproteinase activity and collagen synthesis by endothelial cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.118, n. 2, p. 203-209, Aug. 2000.
- LAMSTER, I. B. et al. Lactate dehydrogenase, beta-glucuronidase and arylsulfatase activity in gingival crevicular fluid associated with experimental gingivitis in man. *J Periodontol*, v.56, n. 3, p. 139-147, Mar. 1985.
- LAST, K. S.; DONKIN, C.; EMBERY, G. Glycosaminoglycans in human gingival crevicular fluid during orthodontic movement. *Arch Oral Biol*, v.33, n. 12, p. 907-912, 1988.
- LEE, H. J. et al. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol*, v.22, n. 11, p. 885-890, Nov. 1995.
- LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 5. ed. Oxford: Ed. Blackwell Munksgaard, 2008.
- MASELLA, R. S.; MEISTER, M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.129, n. 4, p. 458-468, Apr. 2006.
- MEIKLE, M. C. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod*, v.28, n. 3, p. 221-240, Jun. 2006.
- NAHM, D. S. et al. In vitro expression of matrix metalloproteinase-1, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and transforming growth factor-beta1 in human periodontal ligament fibroblasts. *Eur J Orthod*, v.26, n. 2, p. 129-135, Apr. 2004.
- OPPENHEIM, A. A possibility for physiologic orthodontic movement. *Am J Orthod*, v.30, p. 277-328, 1944.
- PENDER, N.; SAMUELS, R. H.; LAST, K. S. The monitoring of orthodontic tooth movement over a 2-year period by analysis of gingival crevicular fluid. *Eur J Orthod*, v.16, n. 6, p. 511-520, Dec. 1994.

PERINETTI, G. et al. Alkaline phosphatase activity in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.122, n. 5, p. 548-556, Nov. 2002.

RATEITSCHAK, K. H.; HERZOG-SPECHT, F.; HOTZ, R. [Reaction and regeneration of the periodontium following treatment with fixed appliances and with removable plates]. *Fortschr Kieferorthop*, v.29, n. 3, p. 415-435, 1968.

REDLICH, M. et al. The effect of mechanical force on mRNA levels of collagenase, collagen type I, and tissue inhibitors of metalloproteinases in gingivae of dogs. *J Dent Res*, v.80, n. 12, p. 2080-2084, Dec. 2001.

REDLICH, M.; SHOSHAN, S.; PALMON, A. Gingival response to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.116, n. 2, p. 152-158, Aug. 1999.

REITAN, K. The initial tissue reaction incident to orthodontic tooth movement as related to the influence of function; an experimental histologic study on animal and human material. *Acta Odontol Scand Suppl*, v.6, p. 1-240, 1951.

REITAN, K.; RYGH, P. Princípios e reações biomecânicas. In: GRABER, T.; VANARSDALL, R. *Ortodontia Princípios e Técnicas Atuais*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. Cap. 2, p. 88-174.

RESCALA, B. *Relação entre níveis de IL-1 β , IL-8 e MMP-8 no fluido crevicular gengival com os sinais clínicos de doença periodontal em pacientes com gengivite e periodontite crônica*. 2005. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

RYGH, P. Ultrastructural cellular reactions in pressure zones of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. *Acta Odontol Scand*, v.30, n. 5, p. 575-593, Nov. 1972.

RYGH, P. et al. Activation of the vascular system: a main mediator of periodontal fiber remodeling in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod*, v.89, n. 6, p. 453-468, June 1986.

SAMUELS, R. H.; PENDER, N.; LAST, K. S. The effects of orthodontic tooth movement on the glycosaminoglycan components of gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*, v.20, n. 5, p. 371-377, May 1993.

SANDY, J. R. Tooth eruption and orthodontic movement. *Br Dent J*, v.172, n. 4, p. 141-149, Feb. 1992.

SANDY, J. R.; FARNDAL, R. W.; MEIKLE, M. C. Recent advances in understanding mechanically induced bone remodeling and their relevance to orthodontic theory and practice. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.103, n. 3, p. 212-222, Mar. 1993.

TAKAHASHI, I. et al. Expression of genes for gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *J Mol Histol*, v.37, n. 8-9, p. 333-342, Nov. 2006.

TAKAHASHI, I. et al. Expression of MMP-8 and MMP-13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. *J Dent Res*, v.82, n. 8, p. 646-651, Aug. 2003.

TEN CATE, A. R.; ANDERSON, R. D. An ultrastructural study of tooth resorption in the kitten. *J Dent Res*, v.65, n. 8, p. 1087-1093, Aug. 1986.

TERVAHARTIALA, T. *Tumor necrosis factor-alfa and matrix metalloproteinases in human periodontal tissue destruction*. 2003. 75 f. Dissertação (Acadêmica) - Faculdade de Medicina, University of Helsinki, Helsinki, 2003.

THILANDER, B.; RYGH, P.; REITAN, K. Reações teciduais em Ortodontia. In: GRABER, T.; VANARSDALL, R. *Ortodontia Princípios e Técnicas Atuais*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. Cap. 2, p. 101-168.

TSUBOTA, M. et al. Expression of MMP-8 and MMP-13 mRNAs in rat periodontium during tooth eruption. *J Dent Res*, v.81, n. 10, p. 673-678, Oct. 2002.

TUNCER, B. B. et al. Levels of interleukin-8 during tooth movement. *Angle Orthod*, v.75, n. 4, p. 631-636, July 2005.

UITTO, V. J. Gingival crevice fluid--an introduction. *Periodontol 2000*, v.31, n. p. 9-11, 2003.

ZACHRISSON, B. U. Gingival condition associated with orthodontic treatment. II. Histologic findings. *Angle Orthod*, v.42, n. 4, p. 353-357, Oct. 1972.

APÊNDICE – Termo de consentimento.



TERMO DE CONSENTIMENTO

Prezado Paciente e/ou Responsável:

Este é um estudo que tem como objetivo avaliar o fluido gengival encontrado próximo a alguns dentes que serão movimentados no tratamento ortodôntico. O procedimento de coleta da saliva será feito com tiras de papel, é indolor e não invasivo. Somente serão selecionados para participar deste estudo, pacientes em cujo plano de tratamento estejam previstas extrações de pré-molares. A participação é voluntária e não irá trazer nenhum malefício ao paciente. Nos dias pré-determinados, é obrigatório o comparecimento, para que sejam realizados os procedimentos clínicos e de coleta do fluido gengival, sem quaisquer ônus.

Os dados gerados neste trabalho são confidenciais e só serão utilizados com fins científicos, como a publicação de artigos, conferências, painéis ou temas-livres.

Eu, _____
 _____ certifico que, lendo as
 informações contidas no termo de consentimento e suficientemente esclarecido(a) sobre
 todos os itens, autorizo a minha participação ou participação do meu filho(a).

Rio de Janeiro, ____ de _____ de 2007.

Nome do paciente participante: _____

Assinatura do Paciente ou Responsável

ANEXO – Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



Rio de Janeiro, 14 de fevereiro de 2008

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof. Paulo José D'Albuquerque Medeiros
Para: Aut. Cristiane Canavarro R. Martins
Orient. Prof. Jonas Capelli Júnior

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (1948-CEP/HUPE) "MEDIADORES PRÓINFLAMATÓRIOS NO FLUIDO GENGIVAL DURANTE O MOVIMENTO DENTÁRIO ORTODÔNTICO" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Prof. Paulo José D'Albuquerque Medeiros
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa