



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Rhita Cristina Cunha Almeida

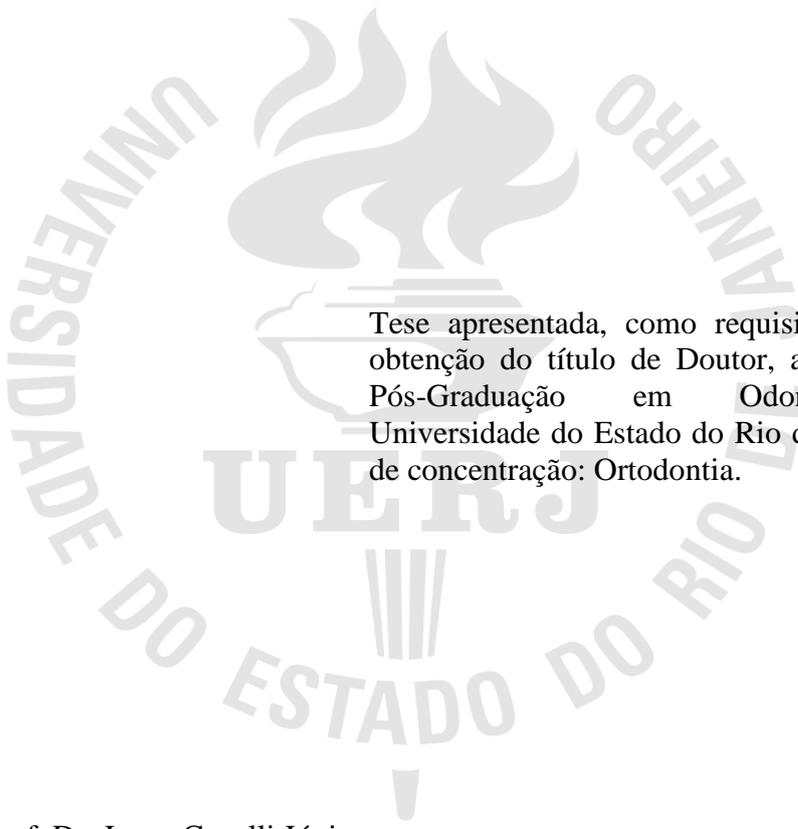
**Efeito do movimento dentário nos níveis de metaloproteinases da matriz no
fluido gengival de pacientes com periodontite controlada**

Rio de Janeiro

2012

Rhita Cristina Cunha Almeida

Efeito do movimento dentário nos níveis de metaloproteinases da matriz no fluido gengival de pacientes com periodontite controlada



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

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

A447 Almeida, Rhita Cristina Cunha.
Efeito do movimento dentário nos níveis de metaloproteinases no fluido gengival de pacientes com doença periodontal controlada / Rhita Cristina Cunha Almeida. – 2012.
92 f.

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

1. Metaloproteinases. 2. Dentes – Mobilidade. 3. Líquido do sulco gengival. 4. Doença periodontal. I. Capelli Junior, 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, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Rhita Cristina Cunha Almeida

Efeito do movimento dentário nos níveis de metaloproteínas da matriz no fluido gengival de pacientes com doença periodontal controlada

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 26 de junho de 2012.

Orientadores: Prof. Dr. Jonas Capelli Júnior
Faculdade de Odontologia - UERJ
Prof. Dr. Ricardo Palmier Teles
Instituto Forsyth

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Flavia Raposo Gebara Artese
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.^a Dra. Telma Martins de Araujo
Faculdade de Odontologia - UFBA

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

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

Ao Felipe, meu grande amor;
À Laura, minha maior alegria;
Aos meus pais, meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Jonas Capelli Junior, pelos ensinamentos, pela confiança e amizade. Tudo fica mais fácil quando lidamos com pessoas competentes, compreensivas, atenciosas, amigas e bem humoradas como você. Estes anos de convívio foram maravilhosos e só me fizeram crescer. Muito obrigada!

Ao meu orientador, professor Ricardo Palmier Teles, por me receber em Boston, pela forma calma que foi me instruindo sobre cada etapa laboratorial e escrita deste trabalho e por estar presente na minha defesa de tese mesmo com seu cronograma tão apertado. Apesar de terem sido períodos curtos de convívio, o tempo passado no Forsyth foi de grande aprendizado e extremamente produtivo. Obrigada!

Agradeço ao meu marido, Felipe, por todos esses anos de sonhos compartilhados e de conquistas a dois. Agradeço por seu apoio, incentivo, ensinamentos, mas, principalmente, por seu amor, carinho, amizade e paciência. Como é bom viver a vida com você.

Agradeço ao meu pai, Marco Antonio, por ser este grande exemplo de profissional e de ser humano. Mesmo com sua jornada de trabalho sendo extremamente atribulada, sempre colocou a nossa família em primeiro lugar, nunca permitindo que o trabalho interferisse no seu papel de pai. Obrigada pelo apoio incondicional, por acreditar em mim, pelos incentivos constantes e por participar intensamente no meu dia a dia, sonhando e lutando junto comigo.

À minha mãe, Maria Helena, por nunca medir esforços para me ajudar em tudo. Por se dedicar à nossa família e ao nosso bem estar integralmente. Saber que posso contar contigo já me tranquiliza para enfrentar qualquer desafio, pois com sua garra e seu bom humor a vida fica muito mais fácil. Você é minha melhor amiga! Espero poder representar para a Laura o que você representa para mim.

Agradeço ao Rhubens, Izabella, meus avós Amélia e Manecão, Aladir e Antonio (em memória) e a toda minha família, por torcerem por mim e por serem uma família extremamente unida que vibra com cada conquista. Espero que nossas agendas continuem sempre lotadas de eventos e comemorações familiares que tanto me fazem bem.

Agradeço à Conceição por ficar com a Laura para que eu pudesse terminar esta tese e por tratá-la da mesma forma calma e carinhosa que sempre me tratou.

Aos meus sogros Paulo Maurício e Rosane por valorizarem nosso esforço em completar mais esta etapa e estarem sempre por perto dispostos a ajudar. À Clarisse e André pelo carinho e amizade.

Aos demais professores do curso de Ortodontia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Dr. Antônio Carlos Peixoto da Silva, nosso chefe, Dr. Álvaro de Moraes Mendes, Dr. Álvaro Francisco Carriello Fernandes, Dra. Cátia Cardoso Abdo Quintão, Dra. Flavia Raposo Gebara Artese, Dra. Ione Helena Vieira Portella Brunharo, Dr. José Augusto Mendes Miguel, Dra. Maria das Graças Carlini, Dra. Maria Teresa de Andrade Goldner e Dra. Vera Lúcia Cosendey Côrte-Real pelos ensinamentos compartilhados, pela paciência e dedicação sempre.

À amiga Cristiane Canavarro pela parceria dentro e fora da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Aos professores e alunos do curso de especialização em Periodontia da UERJ e aos professores da Universidade Estácio de Sá Bruno Rescala e Wilson Rosalem pela ajuda na seleção da amostra.

Aos amigos do Forsyth Institute, Luciana Almeida, Ana Paula e Marcelo Oliveira e Raquel Assed por todo o apoio, ajuda, ensinamentos e paciência comigo.

À Vania, Gilberto, Lucas e Nicolas pela hospedagem carinhosa em Boston.

Aos meus queridos colegas Daniel e Gisele Fernandes pelas ajudas constantes com horários e prazos e pelo convívio sempre agradável.

Aos alunos da especialização, mestrado e doutorado, sempre buscando manter um clima agradável e produtivo dentro da Ortodontia.

A todos os demais alunos que convivem no dia-a-dia da UERJ e aos que conviveram e deixaram saudades.

À Mônica Marques pela paciência, pelos biscoitinhos e pelo carinho de sempre.

À Fernanda pelo bom humor diário e bom convívio.

À Denise, Renata e todos os funcionários da UERJ que facilitam nosso dia a dia e estão sempre dispostos a ajudar.

Principalmente, agradeço a Deus, por tornar este sonho possível.

Antes que você possa alcançar o topo de uma árvore e entender os brotos e as flores, você terá de ir fundo nas raízes, porque o segredo está lá. E, quanto mais fundo vão as raízes, mais alto vai a árvore.

Nietzsche

RESUMO

ALMEIDA, Rhita Cristina Cunha. *Efeito do movimento dentário nos níveis de metaloproteinases da matriz no fluido gengival de pacientes com periodontite controlada*. 2012. 92f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O objetivo deste trabalho foi examinar o impacto da movimentação dentária de dentes periodontalmente comprometidos no volume do fluido gengival crevicular (FGC) e nos níveis de expressão das metaloproteinases de matriz (MMPs) -1, -2, -3, -7, -8, -12 e -13 no FGC. Dez pacientes periodontalmente controlados (8 do sexo feminino e 2 do sexo masculino, média de idade de $46,2 \pm 10,4$ anos) com incisivos projetados labialmente foram submetidos a tratamento ortodôntico. Uma arcada dentária foi submetida a movimentação ortodôntica e a arcada oposta foi usada como controle. Amostras de FGC foram coletadas da face lingual de dois incisivos do lado movimento e dois do lado controle uma semana antes da ativação ortodôntica (-7d), imediatamente após a ativação ortodôntica, e após 1 h, 24 h, e 7, 14 e 21 dias. A coleta do FGC foi feita utilizando-se tiras de papel absorvente e o volume foi calculado através do uso do Periotron. Todos os pacientes receberam orientações de higiene bucal e um kit contendo escova de dente, pasta de dente e bochecho de Clorexidina 0,12% para ser usado durante todo o experimento. A técnica da multianálise imunoenzimática com microesferas foi usada para medir as MMPs no FGC. Os dados foram analisados utilizando-se os testes estatísticos Friedman e Mann-Whitney. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no volume do FGC. Em relação aos níveis de MMPs, a única diferença estatisticamente significativa encontrada no decorrer do tempo foi nos níveis de MMP-1 no grupo movimento ($p < 0,05$). Quando os dois grupos foram comparados após a ativação, a única diferença estatisticamente significativa encontrada foi nos níveis de MMP-12 24 horas após a ativação ($p < 0,05$). Estes achados sugerem que o volume de FGC não sofre alteração relacionada ao movimento dentário ortodôntico e que o movimento ortodôntico de dentes periodontalmente comprometidos não resultou em mudanças significativas nos níveis de MMPs no FGC.

Palavras-chave: Metaloproteinases da matriz. Movimentação dentária. Líquido do sulco gengival.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate whether orthodontic tooth movement of periodontally compromised teeth would result in detectable changes in gingival crevicular fluid (GCF) volume and in the levels of matrix metalloproteinases (MMP) -1, -2, -3, -7, -8, -12 and -13 in the GCF. Ten controlled periodontitis subjects (8 females and 2 males, mean age of 46.2 ± 10.4 years) with flared incisors were submitted to orthodontic treatment. One dental arch was subjected to orthodontic movement, and teeth in the opposite arch were used as controls. GCF samples were collected from the lingual sites of two test and two control incisors one week before orthodontic activation (-7d), immediately after orthodontic activation, and after 1 h, 24 h, and 7, 14 and 21 days. Filter paper strips were used in combination with a Periotron for GCF volume measurements. All patients received hygiene instructions and a kit containing toothbrush, fluoride dentifrice and gluconate chlorhexidine 0.12% mouthwash to be used during all experiment. Multiplexed bead immunoassay was used to measure MMPs in GCF. Data were analyzed using Friedman and Mann-Whitney statistical tests. There were no statistically significant differences over time in the GCF volume for any of the two groups. Regarding the MMPs levels, the only significant change found over time was in the levels of MMP-1 in the movement group ($p < 0.05$). When the two groups were compared after activation, the only statistically significant difference found was in levels of MMP-12 24 h after activation ($p < 0.05$). This findings suggested that the GCF volume could not be associated to orthodontic movement and that the orthodontic movement of periodontally compromised teeth did not result in significant changes in the GCF levels of MMPs.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Caracterização da amostra utilizada no estudo	49
Figura 2 –	Desenho da sequencia do estudo.....	51
Figura 3 –	Técnica de coleta do FGC	52
Gráfico 1 –	Médias das porcentagens dos sítios com sangramento a sondagem (IS) e placa (IP) nos dias -7; no dia da ativação ortodôntica; 24 horas; 7 dias; 14 dias; e 21 dias após o início da movimentação ortodôntica (visitas -7d, 0, 24h, 7d, 14d e 21d respectivamente)	55
Gráfico 2 –	Medianas e intervalos interquartílicos do volume de FGC nos dois grupos nos dias -7; no dia da ativação do aparelho ortodôntico; 1 hora; 24 horas; 7 dias; 14 dias e 21 dias após o início do movimento ortodôntico (visitas -7d, 0, 1h, 24h, 7d, 14d e 21d respectivamente)	56
Gráfico 3 –	Medianas e intervalos interquartílicos dos níveis das MMPs -1, -2, -3, -7, -8, -12 e -13 no FGC nos dois grupos nos dias -7; no dia da ativação do aparelho ortodôntico; 1 hora; 24 horas; 7 dias; 14 dias; e 21 dias após o início do movimento ortodôntico (visitas -7d, 0, 1h, 24h, 7d, 14d e 21d respectivamente)	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartílico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo controle uma semana antes do início da ativação ortodôntica (dia -7).....	57
Tabela 2 –	Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartílico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo movimento uma semana antes do início da ativação ortodôntica (dia -7).....	58
Tabela 3 –	Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartílico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo controle no dia da ativação do aparelho ortodôntico (dia 0).....	58
Tabela 4 –	Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartílico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo movimento no dia da ativação do aparelho ortodôntico (dia 0).....	59
Tabela 5 –	Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartílico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo controle uma hora após a ativação do aparelho ortodôntico (1h).....	59
Tabela 6 –	Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartílico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo movimento uma hora após a ativação do aparelho ortodôntico (1h).....	60

Tabela 7 –	Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartílico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo controle 24 horas após a ativação do aparelho ortodôntico (24h).....	60
Tabela 8 –	Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartílico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo movimento 24 horas após a ativação do aparelho ortodôntico (24h).....	61
Tabela 9 –	Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartílico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo controle uma semana após a ativação do aparelho ortodôntico (7d).....	61
Tabela 10 –	Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartílico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo movimento uma semana após a ativação do aparelho ortodôntico (7d).....	62
Tabela 11 –	Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartílico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo controle duas semanas após a ativação do aparelho ortodôntico (14d).....	62
Tabela 12 –	Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartílico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo movimento duas semanas após a ativação do aparelho ortodôntico (14d).....	63
Tabela 13 –	Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartílico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de	

	P dos níveis de MMPs encontrados no grupo controle três semanas após a ativação do aparelho ortodôntico (21d).....	63
Tabela 14 –	Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartilico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo movimento três semanas após a ativação do aparelho ortodôntico (21d).....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	Fosfatase alcalina
BGC	Bochecho de Gluconato de Clorexidina
CSF	Fator estimulante de colônia
CSF-1	Fator estimulante de colônia de monócito
ECM	Matriz Extracelular
EGF	Fator de crescimento epidermal
EJ	Epitélio juncional
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima
FGC	Fluido gengival crevicular
GM-CSF	Fator estimulador de colônia granulócito-macrófago
HO	Higiene oral
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IFN γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-1 α	Interleucina-1 α
IL-2	Interleucina-2
IL-3	Interleucina-3
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8

IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IP	Índice de placa
IS	Índice de sangramento
LDH	Lactato desidrogenase
LP	Ligamento periodontal
LPMN	Leucócitos polimorfonucleares
MCP	Proteína quimiotática para monócitos
MMP	Metaloproteinase de matriz
OPG	Osteoprotegerina
PG	Prostaglandina
PGE	Prostaglandina E
PGE2	Prostaglandina E2
PHT	Paratormônio
RANK	Fator nuclear ativador-receptor kappa β
RANK-L	Ligante ativador do receptor de fator nuclear kB
RANTES	Citocina regulada sob ativação, liberada e secretada por células T normais
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase transcriptase
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TNF	Fator de necrose tumoral
β G	β -glucuronidase

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1	Doença periodontal	19
1.1.1	<u>Diagnóstico</u>	23
1.2	Fluido gengival crevicular	24
1.2.1	<u>Métodos de coleta e medição do volume do fluido gengival crevicular</u>	25
1.3	Achados utilizando o FGC relacionados à doença periodontal	26
1.4	Movimento dentário ortodôntico	28
1.4.1	<u>Osteoblastos</u>	29
1.4.2	<u>Osteoclastos</u>	29
1.4.3	<u>Fator de Necrose Tumoral (TNF)</u>	30
1.4.4	<u>Fator de Necrose Tumoral (TNF) e sistema RANK/RANK-L/OPG</u>	31
1.4.5	<u>RANK-L</u>	31
1.4.6	<u>Osteoprotegerina (OPG)</u>	32
1.4.7	<u>RANK</u>	32
1.4.8	<u>Citocinas</u>	32
1.4.9	<u>Interleucinas</u>	33
1.4.10	<u>Interferon Gama (IFNγ)</u>	34
1.4.11	<u>Prostaglandina (PGE)</u>	34
1.4.12	<u>Metaloproteinases da Matriz</u>	35
1.5	Achados utilizando o FGC relacionados à Ortodontia	36
1.6	Inter-relação Ortodontia e Periodontia	43
2	PROPOSIÇÃO	47
3	MATERIAL E MÉTODO	48
3.1	Seleção da amostra	48
3.2	Procedimentos clínicos	49
3.3	Coleta de fluido gengival crevicular	51
3.4	Análise laboratorial	52
3.5	Análise estatística	53
4	RESULTADOS	55

4.1	Índice de placa e sangramento à sondagem durante o movimento dentário ortodôntico	55
4.2	Mudanças no volume de FGC durante o movimento dentário ortodôntico	56
4.3	Mudanças nos níveis de MMPs no FGC durante o movimento dentário ortodôntico	57
5	DISCUSSÃO	66
6	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética	92

INTRODUÇÃO

O volume do fluido gengival crevicular (FGC) vem sendo apontado por estudos prévios como um indicador da presença de gengivite e periodontite e já foi inclusive sugerido ser um melhor indicador de inflamação gengival do que as análises clínicas usuais.¹⁻² O fluxo de FGC pode aumentar cerca de 30 vezes na periodontite quando comparado a sulcos saudáveis.³ Os estudos que buscaram associar os efeitos do movimento dentário ortodôntico com alterações no volume do FGC encontraram resultados contrastantes. Alguns observaram aumento do volume⁴⁻⁷ e outros não constataram mudanças significativas, apenas oscilações ao longo do tempo de análise.⁸⁻¹⁰ Esta oscilação do volume do fluido gengival em dentes sob estresse mecânico seria uma alteração associada ao início de um processo inflamatório subsequente. Processo inflamatório que estaria envolvido na cascata de eventos necessários ao movimento dentário ortodôntico.

A remodelação da matriz extracelular (ECM) é um passo crítico em diversos processos biológicos, tais como reparo tecidual, remodelação tecidual e movimento dentário ortodôntico. Durante o movimento dentário ortodôntico há um delicado e bem balanceado processo de remodelação da ECM no periodonto adjacente, com objetivo de permitir o movimento do dente, enquanto mantêm-se a integridade funcional do periodonto. As células mais abundantes no periodonto são os fibroblastos e estas células produzem as metaloproteinases de matriz (MMPs) e os inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) e, ainda, parecem desempenhar um papel importante na manutenção da integridade funcional da ECM periodontal. As MMPs são uma família de enzimas matriz degradantes que estão implicadas na remodelação do ligamento periodontal, tanto em condições fisiológicas como patológicas.¹¹ Acredita-se que as metaloproteinases de matriz (MMPs) são os principais mediadores endógenos da destruição tecidual patológica na doença periodontal.¹²⁻¹³ Os níveis de MMPs no fluido gengival crevicular (FGC)¹⁴⁻¹⁵ e na saliva¹⁶⁻¹⁷ têm sido extensamente estudados e as pesquisas tem demonstrado um aumento nos níveis de MMPs na periodontite quando comparado a pacientes com periodonto saudável. Além disso, o tratamento da doença periodontal resultou em diminuição nos níveis de MMPs no FGC.¹⁸ Níveis elevados de MMP-8¹⁹⁻²⁰, MMP-3²¹ e MMP-13²²⁻²³ no FGC foram associados a progressão da doença periodontal. Já a inibição de MMPs utilizando doxiciclina de baixa dosagem tem sido utilizado como auxiliar no tratamento da periodontite.²⁴⁻²⁶

As metaloproteinases de matriz também participam ativamente na remodelação do ligamento periodontal durante o movimento dentário ortodôntico. Redlich et al.²⁷ encontraram um aumento nos níveis de RNAm e na atividade de MMP-1 no lado pressão durante o movimento dentário ortodôntico em cães. Um aumento na expressão de RNAm de MMP-8, MMP-9 e MMP-13 no ligamento periodontal de ratos durante o movimento dentário ortodôntico também já foi demonstrado.²⁸⁻²⁹ O movimento dentário ortodôntico em ratos ou camundongos pode ser retardado ou até impedido utilizando-se inibidores de MMPs.³⁰⁻³¹ Alguns estudos em humanos quantificaram a presença de MMPs no FGC durante o movimento dentário ortodôntico e reportaram mudanças em seus níveis durante a aplicação de força.^{6, 32-34} Além disso, foi encontrado uma atividade dez vezes mais alta de colagenase total no FGC de pacientes ortodônticos tratados com aparelhagem fixa comparados ao grupo controle.³⁵

Embora a localização de citocinas e mediadores inflamatórios no ligamento periodontal de animais possa ser acompanhada por técnicas de imuno-histoquímica, em humanos é necessário o emprego de um método não invasivo. Portanto, os níveis destas moléculas quantificadas no fluido gengival, proporcionam uma medição indireta das mudanças que ocorrem nos tecidos periodontais, durante a movimentação ortodôntica.¹⁰

Como as MMPs estão envolvidas tanto na destruição da matriz colágena na etiologia da doença periodontal, como na remodelação do ligamento periodontal (LP) na movimentação dentária ortodôntica, é de grande importância analisar a expressão destas enzimas em pacientes periodontais submetidos à movimentação dentária, já que estariam reunidas no mesmo paciente duas variáveis que interferem na expressão de MMPs. É importante considerar que sítios clinicamente saudáveis de indivíduos com periodontite têm níveis mais elevados de biomarcadores do FGC e patógenos periodontais, que sítios clinicamente saudáveis de indivíduos periodontalmente saudáveis¹⁵ e o movimento dentário ortodôntico p estar envolvido no aumento da expressão destes biomarcadores.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Doença periodontal

A patogênese da doença periodontal possui complexas interações, não totalmente compreendidas, entre a microflora periodontal e os sistemas de defesa do organismo. Existe uma variedade de fatores sistêmicos e individuais que são influenciados por fatores locais que podem aumentar, para um paciente ou sítio específico, o risco de destruição do complexo periodontal.³⁶

A defesa do hospedeiro contra a placa bacteriana envolve interações complexas entre o endotélio vascular, elementos celulares e elementos que compõem o fluido das respostas inflamatórias e imunes, e uma vasta rede de mediadores inflamatórios e mensageiros químicos denominados citocinas.³⁶

As células do epitélio oral são fortemente ligadas umas às outras e impermeáveis aos elementos microbianos celulares e do FGC. O epitélio queratinizado, estratificado, escamoso não só cria uma barreira física contra a entrada de toxinas bacterianas e material antigênico como previne a saída de material de defesa do hospedeiro potencialmente danoso. As células do epitélio juncional (EJ), por sua vez, apresentam uma ligação fraca, com grandes espaços intercelulares que permitem a entrada de produtos bacterianos e saída de FGC e elementos celulares do sistema de defesa do sulco gengival do hospedeiro. A perda de inserção periodontal inicia-se com a migração apical das células terminais do EJ. Os queratinócitos do EJ produzem a interleucina 1 (IL-1) que, entre outras ações, estimula a resposta inflamatória. Então, as enzimas e toxinas bacterianas iniciam a destruição do tecido conjuntivo. Durante as fases de inflamação aguda, micro ulcerações do EJ podem ocorrer causando enfraquecimento do epitélio e tendência de sangramento à sondagem. O metabolismo do EJ é maior do que o de qualquer outro epitélio oral.³⁷ Os leucócitos polimorfonucleares (LPMNs) são, provavelmente, as células mais importantes que atuam na defesa do organismo contra a placa bacteriana. Estes estão envolvidos, inicialmente, nas respostas inflamatórias não-específicas, que precedem a resposta imune e, ainda, quando a resposta imune específica é ativada. Os LPMNs são células fagocitárias que são atraídas para a placa bacteriana durante a resposta inflamatória inicial, direcionadas pelos produtos da placa, sistema complemento ou por uma variedade de produtos gerados pela destruição tecidual. Os LPMNs também estão envolvidos

no processo tardio de defesa imunológica mediados pela imunoglobulina G (IgG) ou pelo sistema complemento. O processo de atração dos LPMNs para o sítio de infecção ou dano tecidual é denominado quimiotaxia e as moléculas que atraem os LPMNs são as quimiocinas. Quando chegam ao sítio de infecção, os LPMNs estão aptos a combater as bactérias intra e extra-celularmente.³⁶

Na destruição intra-celular, as bactérias são envolvidas em um fagossoma derivado da membrana celular. Grânulos (ou lisossomas) primários ou secundários que se encontram dentro dos LPMNs fusionam, então, com este fagossoma, formando um fagolisossoma, como parte de um processo denominado degranulação. Uma variedade de enzimas degrada a estrutura bacteriana em moléculas menores que são expelidas dos fagócitos por um processo de fagocitose reversa, denominado exocitose. Os grânulos primários são os maiores responsáveis pela destruição bacteriana intra-celular. Estes grânulos contêm enzimas que incluem colagenase, hialuronidase, catepsina-G, catepsina-D, elastase, ácido fosfatase e mieloperoxidase.³⁶

O macrófago é uma célula fagocitária derivada da estimulação antigênica dos monócitos sanguíneos. Sua função é fundamental no preenchimento do *gap* entre a resposta imune e inflamatória pela apresentação do antígeno aos linfócitos T e B. O macrófago também libera citocinas como a IL-1 e fator de necrose tumoral (TNF) que afetam o endotélio vascular, estimulam LPMNs a penetrar nos tecidos e influenciam células B e T.³⁶

Os linfócitos T são células fundamentais do sistema imune e estão envolvidos na produção de linfocinas (citocinas de origem linfocitária), as quais atraem LPMNs e influenciam outras funções celulares.³⁶

As prostaglandinas e leucotrienos são derivados do ácido aracdônico, os quais são liberados das membranas fosfolipídicas pelas fosfolipases. Este processo ocorre em várias células, particularmente, nos LPMNs, macrófagos, mastócitos e plaquetas. As prostaglandinas são derivadas da ação da ciclooxigenase sob o ácido aracdônico e os leucotrienos pela ação da lipooxigenase.³⁶

As prostaglandinas, especialmente a prostaglandina E₂ (PGE₂), possuem diversas funções nos efeitos pró-inflamatórios.³⁸ A PGE₂ parece ser um dos estimuladores de reabsorção óssea mais potentes, mas também pode induzir vasodilatação e aumentar a permeabilidade capilar assim como vários outros processos pró-inflamatórios.³⁹

As citocinas pró-inflamatórias são proteínas (linfocinas, interleucinas, interferons) produzidas por uma variedade de células. Elas são vitais na mediação das respostas imune e inflamatória contra patógenos bacterianos. A citocina mais pesquisada em estudos de doenças

periodontais é a IL-1 β , originalmente conhecida como fator de ativação osteoclástica.⁴⁰ A IL-1 β afeta o metabolismo ósseo através da regulação das atividades osteoblástica e osteoclástica e, também, pelo seu efeito sob a secreção de prostaglandina E₂ (PGE₂) pelos fibroblastos periodontais e sob a formação de PGE₂ pelo metabolismo do ácido aracdônico.³⁶ A IL-1 β foi descrita como sendo significativamente mais potente do que a IL-1 α na mediação de efeitos catabólicos, especialmente na reabsorção óssea na periodontite.⁴¹⁻⁴² A IL-1 β pode aumentar a expressão e produção de Metaloproteinasas de Matriz, incluindo MMP-1, MMP-3, e MMP-8 e pode estimular a produção de ativadores de plasminogênios.⁴³⁻⁴⁶ Em retorno, MMPs ativas regulam a atividade da IL-1 β .⁴⁷ Além disso, IL-1 β foi descrita como um dos mais potentes indutores de desmineralização óssea na periodontite.⁴⁸ Na doença periodontal, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), Interleucina-1 β (IL-1 β) e Interleucina-6 (IL-6) foram descritos como as principais citocinas pró-inflamatórias, que em conjunto com outras quimiocinas e prostaglandinas, participam da cascata da destruição tecidual.^{39,42,49-51}

O fator de necrose tumoral- α (TNF- α) pode induzir a produção de outras citocinas ou quimiocinas pró-inflamatórias como IL-1 α , -1 β , -6, e -8. Em níveis celulares, TNF- α e IL-1 β aumentam a adesão de leucócitos polimorfonucleares (LPMNs), linfócitos e macrófagos ao endotélio vascular, resultando em aumento da sua migração nos sítios de inflamação.³⁹ TNF- α também pode estimular a expressão de Metaloproteinasas de Matriz, incluindo a MMP-1,⁵²⁻⁵³ MMP-8⁵⁴ e MMP-13,⁵⁵ além de Prostaglandinas E₂.⁵⁶⁻⁵⁷ Além disso, TNF- α e IL-1 junto com RANK-L (ligante ativador do receptor de fator nuclear kB) são mediadores chaves e estimuladores de destruição óssea local.^{54,58-59}

A Interleucina-6 parece ter múltiplas atividades biológicas tanto na defesa do hospedeiro quanto nos processos inflamatórios. Ela participa na reabsorção óssea inibindo a formação óssea.^{42,60} Entretanto, o papel exato da IL-6 como um mediador pró-inflamatório na periodontite não está completamente esclarecido.

Metaloproteinasas da matriz formam uma família de proteases caracterizadas por um sítio de ligação ao Zn⁺⁺ no domínio catalítico (proteinasas ligadas a metal) e pelo fato de serem secretadas como pró-enzimas, as quais requerem processos adicionais para se tornarem ativas. 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.⁶¹ A principal fonte destas enzimas são os fibroblastos e, durante a inflamação, células infiltrantes. Todos os colágenos fibrilares (colágenos tipos I, II e III) podem ser degradados por metaloproteinasas

de matriz como MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18 (também conhecidas como colagenases 1, 2, 3 e 4, respectivamente).⁶²

Metaloproteinases de matriz geralmente são classificadas em diferentes subgrupos, que incluem as gelatinases (MMP-2 e MMP-9), colagenases (MMP-1, MMP-8, e MMP-13), estromelinas (MMP-3, MMP-10, e MMP-11), matrilisinas (MMP-7 e MMP-26), MMPs associadas à membrana (MT1-6 MMPs), e outros tipos.⁶³ Os níveis de expressão destas MMPs são regulados pelos mediadores pró-inflamatórios, tais como as prostaglandinas (PGs) e as interleucinas (ILs).⁶⁴

A metaloproteinase de matriz -1 é uma colagenase que degrada principalmente o colágeno tipo III, é secretada por fibroblastos, células endoteliais, monócitos, macrófagos, osteoblastos e células tumorais.⁴⁹ A MMP-8 degrada principalmente colágenos dos tipos I e II e é a proteinase mais eficiente na degradação do colágeno tipo I. É secretada principalmente por neutrófilos, mas também por fibroblastos gengivais e periodontais, células endoteliais, odontoblastos e células de carcinoma oral e é a forma predominante de colagenase na doença periodontal.⁴⁹ A MMP-13 é uma colagenase dez vezes mais eficiente que as outras na degradação do colágeno tipo II.⁶⁵

Entre as gelatinases, a MMP-2 é produzida predominantemente por fibroblastos e outras células do tecido conectivo e a MMP-9 é produzida principalmente por neutrófilos.⁴⁹ Ambas aparecem aumentadas na presença de doença periodontal.⁶⁶⁻⁶⁸

O grupo das estromelinas (MMP-3, -10, -11, -12) degrada vários componentes da matriz extracelular e pode ativar outros proMMPs como proMMP-1, -8, -9 e -13. A MMP-3 ainda pode interferir no processo inflamatório processando citocinas como IL-1 β e TNF- α .⁶⁹⁻

70

No grupo das matrilisinas, a MMP-7 degrada componentes da matriz e pode ativar aumento de TNF- α , proMMP-2, proMMP-9 e proMMP-8. Além disso, a MMP-7 parece ter participação na defesa do hospedeiro ativando peptídeos antibacterianos.⁷¹⁻⁷³

As quimiocinas estão estruturalmente relacionadas a citocinas pró-inflamatórias e são capazes de recrutar e ativar células inflamatórias de forma seletiva.⁷⁴ Quimiocinas incluem Interleucina-8 (IL-8), proteína quimiotática para monócitos (MCP) e citocina regulada sob ativação, liberada e regulada por células T normais (RANTES).

Em todos os campos da medicina, pesquisadores estão buscando marcadores biológicos que facilitem o diagnóstico das diversas doenças. Um marcador biológico ideal deve indicar a presença de uma doença antes de ocorrerem danos clínicos extensos. O

marcador deve ter alta especificidade e sensibilidade e deve poder ser usado de forma fácil em testes de cadeira ou domiciliais.⁷⁵

1.1.1 Diagnóstico

A identificação de apenas um marcador diagnóstico para todas as formas de doença periodontal é impossível, diante da complexidade da periodontite. Entretanto, pesquisadores têm buscado marcadores fidedignos da periodontite no fluido gengival crevicular com o objetivo de desenvolver um teste simples, que possa ser usado no consultório, para determinar se o paciente tem um quadro de periodontite e precisa de tratamento ou apenas possui uma gengivite sem maior gravidade.⁷⁵

O indicador mais utilizado é o de sangramento à sondagem, entretanto, os sinais clínicos de doença periodontal não são capazes de revelar o verdadeiro grau de atividade da doença. Mensurações de sangramento à sondagem e supuração são indicativos da presença de inflamação. Entretanto, elas representam baixos valores preditivos positivos para a progressão da doença, tanto para os níveis relacionados ao indivíduo como para os sítios. Estas limitações podem resultar em sobre tratamento de sítios saudáveis baseados na presença de inflamação clínica e uma falta de tratamento em sítios com risco de progressão.³⁶

Assim, são necessários testes de diagnóstico baseados na identificação de grupos específicos de bactérias em placas subgengivais, detecção de mediadores imunoinflamatórios da doença e produtos de colapso tecidual e celular. Um teste bacteriano específico seria um teste imunológico que detecta antígenos de superfície de três espécies de bactérias associadas com a doença periodontal: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*.³⁶

A aplicação da biologia molecular no diagnóstico periodontal levou ao desenvolvimento de sondas de DNA e RNA que identificam sequências de nucleotídeos de organismos causadores de doença periodontal.³⁶ A vantagem de testes microbiológicos é a habilidade de detectar a presença de patógenos conhecidos, entretanto a complexidade da doença periodontal sugere que a identificação de apenas um número limitado de espécies não pode ser visto como um pré-determinante da atividade da doença. Mesmo assim, esses testes fornecem informações úteis sobre re-infecções.³⁶

Mediadores imunoinflamatórios e produtos de células e tecidos destruídos podem ser detectados no fluido gengival, sendo coletados por tiras de papel absorvente posicionadas no sulco gengival. Enzimas que são liberadas por leucócitos polimorfonucleares durante a reação inflamatória, incluem β -glucuronidase, elastase e proteases neutrais não-específicas, todas já bastante estudadas e incorporadas em testes de diagnóstico.³⁶

1.2 Fluido gengival crevicular

Embora a existência do fluido gengival crevicular seja conhecida por mais de 100 anos, a natureza exata deste fluido, sua origem e composição tem gerado controvérsias.⁷⁶

O fluido gengival crevicular (FGC) emerge entre a superfície dentária e a camada externa do epitélio juncional. Em saúde, representa um fluido intersticial que aparece no sulco como um resultado de um gradiente osmótico e é considerado um transudato. Com o acúmulo de placa ocorre uma resposta inflamatória no tecido gengival, resultando em um aumento de permeabilidade nos capilares e uma elevação do fluxo do FGC. Neste estágio, o FGC torna-se um verdadeiro exsudato, com uma concentração de proteínas similar à do soro.⁷⁷ Durante a passagem do tecido gengival para o sulco, este exsudato carrega vários componentes celulares e moleculares da resposta imunológica presentes no soro, assim como mediadores e produtos da destruição tecidual gerados nos tecidos.⁷⁶

O fluido gengival crevicular é uma mistura complexa de substâncias como leucócitos, células estruturais do periodonto e bactérias orais. Essas substâncias tem alto potencial para indicar a presença de atividade da doença periodontal e cura após terapia.³ Pesquisas têm sugerido que o aumento no volume de fluido gengival crevicular pode ser um sinal de inflamação subclínica e sítios classificados como saudáveis por critérios clínicos teriam possivelmente variações no grau de inflamação subclínica.^{1-2,78} Esta explicação é suportada por achados histológicos que mostram que tecido gengival totalmente livre de células inflamatórias provavelmente não existe. Estendendo este argumento para a produção de fluido gengival crevicular, todos os sítios teriam o fluido, mesmo os classificados como saudáveis por critérios clínicos.⁷⁶

1.2.1 Métodos de coleta e medição do volume do fluido gengival crevicular

No método de lavagem gengival, é colocada solução isotônica no crevículo gengival, normalmente com um volume pré-determinado. O fluido coletado posteriormente representa uma diluição do fluido crevicular e contém células e constituintes solúveis como proteínas de plasma.⁷⁶

No método de micropipetas, o sítio é isolado e seco, tubos capilares com diâmetros internos previamente conhecidos são inseridos na entrada do sulco gengival. O fluido migra para o tubo por ação capilar e pelo fato do diâmetro do tubo ser conhecido, o volume do fluido pode ser determinado medindo a distância que o fluido migrou. Esta técnica é favorável pois fornece uma amostra não diluída e o volume pode ser medido com precisão. Entretanto, é um método demorado, em sítios saudáveis pode ser impossível obter um volume adequado, e é difícil a remoção da amostra de dentro do tubo.⁷⁶

Existe ainda o método de tiras de papel absorventes. As vantagens desta técnica são ser rápida e fácil, poder ser aplicada a sítios individuais e ser a menos traumática. A princípio, o propósito das pesquisas era determinar apenas se havia ou não fluido gengival num determinado lugar. A quantidade de fluido colhido na tira era definida pela distância que o fluido migrou na tira.⁷⁶

Com a introdução do Periotron (aparato eletrônico de medição) tornou-se possível determinar precisamente o volume do fluido presente na tira de papel e possibilitou investigações laboratoriais subsequentes. Este instrumento mede o efeito na corrente elétrica da tira de papel molhada. Ele tem duas pontas metálicas que agem como platôs de um condensador elétrico. Se uma tira seca for colocada entre essas pontas o circuito elétrico registra zero no leitor digital. A tira molhada irá então aumentar a capacitância em proporção ao volume do fluido e a medida é mostrada no leitor digital. A técnica é rápida e não altera a amostra de fluido.⁷⁶

Existem limitações na coleta e interpretação de dados do fluido gengival crevicular e um deles é a contaminação. As principais formas de contaminação são com saliva, sangue ou placa. A presença de placa altera o volume do fluido e por isso toda a placa deve ser removida antes da coleta do material. O sítio deve ser adequadamente isolado com rolos de algodão para minimizar a contaminação por saliva. Qualquer amostra contaminada deve ser descartada.⁷⁶

1.3 Achados utilizando o FGC relacionados à doença periodontal

Estudos têm procurado uma associação entre a quantidade total ou a concentração de diferentes constituintes do FGC e o *status* de saúde periodontal.⁷⁹⁻⁸¹ Visto que a resposta do hospedeiro é um determinante crítico na patogênese da periodontite, a mensuração dos níveis dos mediadores inflamatórios tem sido usada para avaliação de risco. Este risco pode estar relacionado diretamente à chance de um sítio perder inserção clínica ou à possibilidade do indivíduo vir a desenvolver doença periodontal.⁷⁹

Colagenases ativas, que estão envolvidas na colagenólise durante a doença periodontal, têm sido identificadas no fluido do sulco gengival. Seus níveis enzimáticos parecem aumentar linearmente com a intensidade da inflamação gengival.⁸¹⁻⁸²

Duas das MMPs mais estudadas no FGC são a colagenase 2 (MMP-8) e a gelatinase B (MMP-9), ambas produzidas por neutrófilos.⁸³ Estas são as principais enzimas que degradam colágeno no FGC e saliva, e são consideradas as principais responsáveis pela quebra de colágeno durante a gengivite e a periodontite crônica.⁸⁴ Altos níveis de MMP-8 foram achados no FGC de pacientes com periodontite^{66, 84-85} e tem sido sugerido como um marcador viável para monitoração da condição periodontal.⁸⁶⁻⁸⁷ Outros trabalhos mostraram que o tratamento periodontal resultou em uma redução dos níveis de MMP-8 no FGC.^{86,88-89}

Em um estudo de Nomura et al.,⁹⁰ não foram encontradas diferenças nos níveis de atividade da MMP-8 entre pacientes com periodontite e gengivite. Este resultado sugere que a MMP-8 se eleva devido a processos inflamatórios, não necessariamente relacionados à doença periodontal. Entretanto, Mancini et al.⁹¹ propuseram o uso dos níveis de MMP-8 no fluido gengival crevicular como um teste para detectar destruição periodontal ativa e encontraram que os níveis estavam 18 vezes maiores na periodontite progressiva do que na periodontite controlada. Em um estudo longitudinal com pacientes com gengivite, periodontite controlada e periodontite ativa, Lee et al.⁸⁵ estimaram que a atividade colagenolítica total (provavelmente com predomínio de atividade de MMP-8) era 50% mais alta no grupo com doença ativa.

A presença de MMP-8 no fluido gengival crevicular pode ter um valor diagnóstico como marcador de periodontite, mas a associação do mesmo com a doença periodontal ainda não é evidente. Isso ocorre porque a MMP-8 tem uma forma latente e uma forma ativa. A enzima latente pode estar presente na gengivite e a forma ativa na periodontite e assim os níveis de atividade da MMP-8 é que poderiam discriminar entre estas duas formas de doença.

Devido ao potencial destrutivo destas proteases, sua atividade é estritamente regulada por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Estas moléculas funcionam através da formação de complexos não-covalentes de alta afinidade, virtualmente irreversíveis, com as formas ativas de metaloproteinases.⁶¹ A presença de baixos níveis de TIMP-1 no FGC de pacientes com periodontite crônica, tem sido apontada como uma justificativa para o uso de inibidores de collagenases como uma abordagem terapêutica no tratamento da doença periodontal, de fato, níveis farmacológicos de doxiciclina podem diretamente inibir MMPs derivadas de polimorfonucleares infiltrantes.^{24,67,83,92}

As concentrações de TNF- α também foram pesquisadas no FGC de pacientes com periodontite e embora ela tenha sido descrita como uma das principais citocinas pró-inflamatórias que atuam na destruição tecidual, a concentração encontrada no FGC foi relativamente baixa.⁵¹ Os tecidos periodontais que foram removidos dos mesmos sítios da coleta do FGC demonstraram níveis significativamente mais altos de TNF- α do que no FGC.

A IL-1 β é um dos mediadores mais investigados no FGC.⁹³⁻¹⁰⁵ Em modelos de gengivite experimental os níveis desta citocina apresentam elevação com o passar do tempo;¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ apresentam-se elevados em pacientes com periodontite quando comparados com controles saudáveis e com gengivite;^{101,108-109} estão em níveis mais elevados em sítios ativos *versus* inativos⁹⁶ e apresentam declínio após tratamento.^{93,96,99,101,110-111}

Níveis elevados de IL-1 α também já foi detectado no fluido gengival crevicular de pacientes com doença periodontal.^{103,112}

Diversos estudos também já descreveram aumento da expressão de IL-6 no FGC e nos tecidos gengivais de pacientes com periodontite;^{85,104,113-115} entretanto, existem outros trabalhos que contradizem este fato.^{39,116}

Alguns estudos sugerem uma relação entre os níveis de IL-8 e atividade de doença periodontal. Foi demonstrado que a quantidade total de IL-8 estava significativamente aumentada no FGC de sítios doentes de pacientes com periodontite crônica quando comparadas com sítios saudáveis ou com gengivite de pacientes controles.^{96,105,109,117} Gamonal et al.⁹⁶ encontraram níveis mais elevados deste mediador em pacientes com periodontite (316,7 ng/ml), comparado a indivíduos saudáveis (188,9 ng/ml). Cabe ressaltar que no mesmo grupo de pacientes, sítios ativos apresentavam maiores concentrações de IL-8 (247,1 ng/ml) se comparados a sítios estáveis (163,6 ng/ml). A redução dos níveis de IL-8 após terapia periodontal também foi relatada. Entretanto, outros trabalhos mostraram uma relação inversa entre IL-8 e atividade de doença.¹¹⁸⁻¹¹⁹ Jin et al.¹²⁰ demonstraram que depois de um mês de

raspagem e alisamento radicular, os níveis de IL-8 diminuíram em 16 indivíduos com periodontite crônica, principalmente nos sítios com gengivite. Surpreendentemente, o mesmo grupo encontrou que os níveis de IL-8 apresentavam uma correlação inversa com a severidade da doença. Um mês após o tratamento, sítios saudáveis ainda apresentavam uma concentração elevada (224,3 pg/μl) quando comparados com sítios com gengivite (46,5 pg/μl) e sítios com periodontite (81,0 pg/μl). O mesmo grupo relatou dados similares em um trabalho anterior, onde indivíduos controles apresentavam uma média na concentração de IL-8 de 3671,54 pg/μl; sítios saudáveis de pacientes com periodontite apresentavam 339,16 pg/μl; sítios com gengivite apresentavam 213,52 pg/μl e; sítios com perda de inserção apresentavam 128,61 pg/μl.¹¹⁹ Chung et al.¹¹⁸ encontraram menores concentrações de IL-8 em pacientes com periodontite antes do tratamento, no entanto, os valores totais desta citocina não diferiam dos controles.

Níveis elevados de PGE₂ também já foram detectados no FGC de adultos com periodontite¹²¹⁻¹²² e é considerada um dos mais importantes mediadores pró-inflamatórios da periodontite.

1.4 Movimento dentário ortodôntico

O tratamento ortodôntico em pacientes adultos está cada vez mais comum. Embora idade não seja uma contraindicação para o tratamento ortodôntico, com o passar dos anos, a atividade celular diminui e os tecidos se tornam mais ricos em colágeno.¹²³ Assim, a resposta tecidual às forças ortodônticas, incluindo tanto mobilização celular quanto conversão de fibras colágenas, é bem mais lenta no adulto do que na criança e no adolescente.¹²³

O movimento dentário é o resultado do efeito da mecânico-transdução na expressão de numerosos genes que regulam a remodelação dos tecidos periodontais. Esse processo é muito complexo, com numerosas moléculas agindo em vários tecidos resultando em sua inibição ou estímulo. Assim, o controle do ganho ou perda de massa óssea se baseia fundamentalmente na osteoclastogênese e em três moléculas reguladoras da osteoclastogênese, que são a Osteoprotegerina (OPG) sintetizada por pré-osteoblastos e osteoblastos, RANK Ligante (RANK-L – Fator nuclear ativador-receptor kappa β ligante) e o seu receptor RANK (Fator nuclear ativador-receptor kappa β), expresso nos precursores osteoclásticos.¹²⁴⁻¹²⁵

1.4.1 Osteoblastos

O osso é formado pelos osteoblastos que derivam de células mesenquimais primitivas, chamadas células osteoprogenitoras e que ocupam todos os locais ativos da formação óssea.¹²⁶

As funções primárias dos osteoblastos são sintetizar a parte orgânica da matriz óssea e participar na formação da matriz inorgânica. A matriz óssea consiste em 35% de material orgânico, dos quais grande parte corresponde ao colágeno tipo I, ao lado de outras macromoléculas, como proteoglicanos, proteínas envolvidas na mineralização, proteínas ligantes de cálcio, proteínas de adesão celular, citocinas, fatores de crescimento e enzimas, além da água. A matriz orgânica é permeada por cristais de hidroxiapatita que perfazem os 65% remanescentes do tecido ósseo.¹²⁷ Os osteoblastos também secretam metaloproteinases da matriz (MMPs) dentro da matriz óssea extracelular, em uma forma inativa, junto com inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs).¹²⁸

Em adição a sua função primária, que é a produção de matriz óssea, os osteoblastos também liberam fatores de crescimento e citocinas que agem de modo autócrino para regular a atividade osteoblástica e de modo parácrino para influenciar outras células, principalmente os osteoclastos. Os indutores da reabsorção óssea, como o paratormônio (PTH), a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF), apresentam efeitos diretos mínimos ou nulos sobre os osteoclastos. Na verdade, os receptores para essas substâncias são encontrados nos osteoblastos.¹²⁹ Os osteoblastos regulam não somente a formação óssea, mas também a reabsorção óssea por meio da sinalização que controla a geração e atividade dos osteoclastos.¹³⁰ Os osteoblastos também promovem a formação de novos vasos sanguíneos, que são essenciais para a nova formação óssea e para reparar o defeito ósseo.¹³¹

1.4.2 Osteoclastos

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas, responsáveis pela reabsorção óssea, móveis, fagocitárias e encontradas ao longo da superfície endóstea cortical e nas lacunas de Howship (áreas de reabsorção). Originam-se das células do sistema monócitos/macrófagos (sistema hematopoiético). A osteoclastogênese começa com estímulo

das células hematopoiéticas, que então se diferenciam em pré-osteoclastos que se fundem com outras células semelhantes para formar um osteoclasto imaturo multinuclear.^{126, 128, 132-133}

Os osteoclastos apresentam como função a reabsorção ativa do osso mineralizado, participando, juntamente com os osteoblastos, do processo de remodelação constante do osso. Quando em atividade, os osteoclastos maduros repousam sobre a superfície do osso e, através de erosão pela ação enzimática (proteases), formam uma depressão pouco profunda conhecida como Lacuna de Howship ou lacuna de reabsorção, criada pela própria atividade reabsortiva desta célula.¹²⁶ Devido ao seu tamanho e à atividade metabólica, um único osteoclasto pode reabsorver a matriz óssea depositada por 100 osteoblastos. Esse fenômeno justifica porque os osteoclastos não são encontrados em grande número, mesmo em áreas com intensa atividade de reabsorção.¹³⁴

Na remodelação óssea a fase de reabsorção é seguida por uma fase de formação óssea. A fase de reabsorção do ciclo de formação-reabsorção do osso leva aproximadamente 8 a 10 dias. Este é o ciclo de vida dos osteoclastos multinucleares. Evidências morfológicas e bioquímicas indicam que os osteoclastos velhos sofrem apoptose, um processo que envolve condensação da cromatina e fragmentação de DNA.¹³⁵⁻¹³⁶ A reabsorção óssea ocorre sob osteoclastos estacionários em regiões de células caracterizadas por intensa mobilidade citoplasmática e tráfico vesicular. Após a remoção do osso e a criação de uma cavidade de reabsorção os osteoclastos podem se mover lateralmente e começar uma nova cavidade de reabsorção.¹²⁸

1.4.3 Fator de Necrose Tumoral

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) é uma citocina pró-inflamatória que frequentemente é liberada em várias doenças inflamatórias tais como artrite reumatóide e doença periodontal. O TNF é produzido por muitas células cancerígenas assim como pelas células ósseas. O TNF aumenta a proliferação e diferenciação de precursores de osteoclasto e a atividade osteoclástica tanto pela ação direta RANK/RANK-L como pelo aumento da expressão de IL-6. Um membro da família receptor do TNF, a osteoprotegerina (OPG), bloqueia regulando a formação de osteoclastos.¹³⁷ Em contraste, a secreção do RANK-L pelos osteoblastos em resposta ao estímulo pelo PHT e IL-1 aumenta a atividade osteoclástica.

Estudos *in vivo* demonstraram que a TNF- α foi liberada no ligamento periodontal e osso alveolar durante o movimento dentário ortodôntico.¹³⁸⁻¹³⁹

1.4.4 Fator de Necrose Tumoral e sistema RANK/RANK-L/OPG

O papel das citocinas do sistema RANK/RANK-L/OPG na indução da remodelação óssea foi demonstrado por Theoleyre et al.¹²⁴ O TNF relacionado ao RANK-L e seus dois receptores RANK e OPG estão envolvidos no processo de remodelação óssea.¹⁴⁰ O RANK-L é um regulador da formação e ativação de osteoclastos. No sistema ósseo, o RANK-L é expresso nas células da linhagem osteoblástica e exerce seus efeitos ligando ao receptor RANK nas células da linhagem osteoclástica. Essa ligação leva à rápida diferenciação dos precursores osteoclásticos hematopoiéticos a osteoclastos maduros. A OPG é um receptor produzido pelas células osteoblásticas, que compete com o RANK para se unir ao RANK-L. O efeito biológico da OPG nas células ósseas inclui inibição dos estágios terminais da diferenciação osteoclástica, supressão da ativação dos osteoclastos da matriz e indução da apoptose. A remodelação óssea é, portanto, controlada pelo equilíbrio entre a produção de RANK/RANK-L/OPG.¹⁴¹

1.4.5 RANK-L

Acrônimo derivado da língua inglesa que significa “receptor activator of nuclear factor- κ B ligand” o RANK-L é secretado pelos osteoblastos e regula positivamente a osteoclastogênese, sendo uma das moléculas chave na formação dos osteoclastos. Ele se liga ao seu receptor RANK, que é expresso na membrana dos precursores dos osteoclastos, de maneira parácrina, ativando pré-osteoclastos e osteoclastos maduros para a remodelação óssea em resposta aos estímulos mecânicos, tais como, a aplicação de força ortodôntica.¹¹

A diferenciação osteoclástica pode ser inibida tanto *in vivo* como *in vitro*, quando a ligação RANK-L com o RANK é impedida. Assim o RANK-L passa a ligar-se a outra proteína circulante, a OPG.¹⁴²

1.4.6 Osteoprotegerina

A osteoprotegerina (OPG) é uma citocina pertencente à família receptores do TNF. É uma proteína circulante produzida pelos pré-osteoblastos e osteoblastos, em resposta aos fatores osteotrópicos ou citocinas, que inibem a formação de osteoclastos pela união com o RANK-L expresso em osteoblastos, regulando assim, negativamente a osteoclastogênese.¹⁴²⁻

¹⁴⁴A OPG é um antagonista do RANK, age como um receptor alvo solúvel, e se une ao receptor do RANK (RANK-L) nos osteoblastos, bloqueando assim a ligação entre RANK/RANK-L, entre osteoblastos e precursores dos osteoclastos, inibindo a diferenciação do precursor do osteoclasto em osteoclasto maduro, prevenindo então a reabsorção óssea.^{125,145}

1.4.7 RANK

Acrônimo derivado da língua inglesa que significa “receptor activator of nuclear factor- κ B” é uma proteína receptora para o RANK-L que é liberada por precursores de osteoclásticos e por osteoclastos maduros, ativando a osteoclastogênese.¹⁴⁶⁻¹⁴⁷

1.4.8 Citocinas

As citocinas estão envolvidas em iniciar, ampliar, perpetuar e resolver a resposta inflamatória.¹⁰ As citocinas são classificadas como pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

As citocinas induzem a proliferação celular, diferenciação e estímulo na remodelação óssea. Apesar de serem substâncias osteolíticas, são os osteoblastos que possuem receptores para esses fatores e também os produzem. Estudos prévios têm mostrado o envolvimento de certas citocinas (IL-1 e IL-6) na remodelação óssea *in vivo* e *in vitro*.¹⁴⁸

As citocinas que afetam o metabolismo ósseo incluem IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, PGE e o Interferon Gama (IFN γ), porém a principal citocina reguladora da

reabsorção óssea é a IL-1, que é uma estimuladora potente da atividade de osteoclastos maduros, sendo inclusive chamada de fator de diferenciação de osteoclastos.¹⁴⁹⁻¹⁵⁰

1.4.9 Interleucinas

As Interleucinas, uma família de citocinas, são produzidas por muitos tipos de células, mas principalmente pelos linfócitos, leucócitos e macrófagos ativados. Regula a diferenciação das células efetoras do sistema imune. Muitas células que não pertencem ao sistema imune, tais como os fibroblastos e queratinócitos também são capazes de secretar interleucinas. Além de seus efeitos reguladores nas células do sistema imune, as interleucinas influenciam na atividade de uma grande variedade de células, incluindo aquelas do sistema esquelético. A reabsorção óssea observada em locais de inflamação é provavelmente causada pela produção local de interleucinas e prostaglandinas que agem na expressão da OPG e RANK/RANK-L, alterando, deste modo, o equilíbrio em favor da osteoclastogênese.¹⁴⁴

Entre as interleucinas, a IL-1 é a mais potente e estimula diretamente a função dos osteoclastos afetando todas as etapas da osteoclastogênese com um aumento da formação e a atividade de osteoclastos. A secreção de IL-1 é ativada por vários estímulos, incluindo neurotransmissores, produtos bacterianos, outras citocinas e forças mecânicas. A IL-1 aparece em duas formas, alfa e beta, estas são de códigos genéticos diferentes, mas têm atividades similares, como propriedades quimiotáticas, regulação de metabolismo celular de tecidos conectivos, estímulo de liberação de prostaglandinas por fibroblastos e aumento de reabsorção óssea. A Interleucina-1 α é primariamente associada a células e não é encontrada em fluidos ou transudatos. A IL-1 β é a principal forma envolvida no metabolismo ósseo, estimulando a reabsorção e inibindo a formação óssea.¹⁵¹⁻¹⁵² A IL-1 β desempenha um papel importante no processo inflamatório. Monócitos ativados, macrófagos, células T, neutrófilos, fibroblastos e células epiteliais produzem IL-1 durante a inflamação. Acredita-se que a produção local de PGE₂ e IL-1 nos tecidos conjuntivos periodontais e gengiva inflamada estimulam a reabsorção óssea, e que as interleucinas desempenham um papel importante na remodelação do ligamento periodontal após força induzida mecanicamente.¹⁵³⁻¹⁵⁴

Osteoblastos são as células alvo para IL-1 que em resposta envia mensagens para os osteoclastos reabsorverem osso.¹⁵⁵ A IL-1 β pode agir em sinergia com o TNF- α como um potente indutor da IL-6.¹⁵⁶ A IL-1 β e TNF- α estão envolvidas no estímulo da reabsorção

óssea, enquanto IL-4 e IL-3 são citocinas que inibem a reabsorção óssea.¹⁵⁷ A reabsorção óssea é inibida pelo aumento da expressão de OPG diminuindo a ligação do RANK e RANK-L, pelo estímulo à atividade dos osteoblastos e pela diminuição do número de osteoclastos.¹⁵⁸

A Interleucina-2 estimula a atividade osteoclástica indiretamente pelo aumento da expressão osteoblástica do Fator estimulante de colônia de monócito (CSF-1) e IL-6.¹⁵⁹

A IL-6 é uma citocina multifuncional produzida por muitas células. Potencializa o efeito de outros hormônios e participa da formação de osteoclasto *in vitro*. Os níveis de IL-1 β e IL-6 estão significativamente mais elevados na gengiva inflamada quando comparado ao tecido gengival sadio em adultos jovens. A IL-6 promove a reabsorção óssea através de um aumento da proliferação de pré-osteoclastos.¹⁶⁰⁻¹⁶¹

A IL-4, IL-10 e IL-13 diminuem a reabsorção óssea inibindo a formação e a ativação de osteoclastos.¹⁶²⁻¹⁶³

1.4.10 Interferon Gama (IFN γ)

O Interferon Gama (IFN γ) é outra citocina pró-inflamatória associada com a reabsorção óssea e, portanto, com o movimento dentário. O IFN γ estimula diretamente a diferenciação de progenitores de osteoclastos, é um marcador precoce da ativação imune da inflamação, estimula a síntese de outras citocinas, tais como a IL-1 e o TNF e pode causar reabsorção óssea durante o movimento dentário.^{5,140}

1.4.11 Prostaglandina (PGE)

A Prostaglandina (PGE) é liberada pelos osteoblastos em resposta à carga mecânica e estimula a formação óssea¹⁶⁴ e a proliferação das células ósseas.¹⁶⁵ A PGE₂ não somente estimula os osteoblastos existentes, mas também aumenta a produção de osteoblastos através do recrutamento e diferenciação de células precursoras em osteoblastos ativos.¹⁶⁶

A PGE₂ também estimula a atividade osteoclástica dependendo da concentração de prostaglandina no local.¹⁵³ Tanto o número quanto o tamanho dos osteoclastos aumentam sob a influência da PGE₂. Estudos *in vitro* têm mostrado que o efeito estimulante dos osteoclastos

pela PGE₂ é mediado pelos osteoblastos. Estes, quando estimulados pela PGE₂, contraem e expõem a superfície óssea aos pré-osteoclastos.¹⁶⁷ A reabsorção é bloqueada por anticorpos direcionados contra a IL-1 sugerindo que a reabsorção óssea osteoclástica estimulada pela PGE₂ pode ser causada pelo aumento da produção de IL-1. Como as prostaglandinas e interleucinas têm um tempo de vida curto (2 a 3 minutos) seus efeitos são locais e de ação curta.¹⁶⁸

Estudos foram feitos em animais experimentais a respeito do efeito das prostaglandinas sobre a movimentação ortodôntica. Todos são unânimes na conclusão de que a injeção local dessa substância no periodonto de dentes submetidos à força ortodôntica induz a uma rápida remodelação óssea e um aumento na velocidade do movimento dentário.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ Porém, um grande problema da administração local das PGs é o desconforto, já que as prostaglandinas são mediadores da dor. A maioria dos estudos com prostaglandinas E₂ tem demonstrado um aumento no risco de reabsorção radicular proporcional ao aumento no ritmo do movimento dentário.¹⁶⁹

1.4.12 Metaloproteinases da Matriz

Durante o movimento dentário ortodôntico há um delicado e bem balanceado processo de remodelação da matriz extracelular no periodonto adjacente, com objetivo de permitir o movimento do dente, enquanto mantêm-se a integridade funcional do periodonto. As células mais abundantes no periodonto são os fibroblastos e estas células produzem metaloproteinases da matriz (MMPs) e inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) e parecem desempenhar um papel importante na manutenção da integridade funcional da matriz extracelular periodontal. As MMPs são uma família de enzimas de degradação da matriz que estão implicadas na remodelação do ligamento periodontal, tanto em condições fisiológicas como patológicas.^{6,170}

A expressão dos níveis de MMP-8 e MMP-13 foi estudada por hibridização *in situ* e reação em cadeia da polimerase transcriptase (RT-PCR) no movimento dentário de ratos, considerando lados de pressão e tensão. Ambas metaloproteinases da matriz aumentaram temporariamente seus níveis durante o movimento ativo, diferencialmente regulado por forças de pressão e tensão e pareceram desempenhar importante papel na remodelação do ligamento periodontal.²⁸

Através da técnica de hibridização *in situ* foi analisada a expressão dos níveis de MMP-2, MMP-9 e TIMP-1-3 em dentes de ratos submetidos à movimentação. A expressão dos níveis destes genes esteve aumentada temporariamente em 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. Pode-se concluir que os níveis de MMP-2 e MMP-9 aumentam 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, TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 aparecem para regular diferencialmente as várias regiões dos tecidos do ligamento periodontal 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 ligamento periodontal durante o movimento dentário ortodôntico.⁶⁴

1.5 Achados utilizando o FGC relacionados à Ortodontia

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.^{36,147,171-172} O aumento do fluxo do fluido pode ser constatado em dentes sob movimentação ortodôntica, assim como sua redução durante a fase de contenção do tratamento ortodôntico, quando os movimentos dentários cessam.¹⁷³ Esta oscilação do volume do fluido gengival em dentes sob estresse mecânico seria uma alteração associada ao início de um processo inflamatório subsequente. Processo inflamatório que estaria envolvido na cascata de eventos necessários ao movimento dentário ortodôntico.^{36,147,172}

Drummond et al.¹⁷⁴ estudaram 16 pacientes com periodonto saudável com necessidade de retração dos caninos superiores após extração dos primeiros pré-molares. Não encontraram diferenças estatisticamente significativas nas alterações do volume de fluido gengival crevicular. Já Capelli et al.,¹⁷⁵ que utilizaram metodologia semelhante, encontraram diferença no volume de FGC no lado de pressão (face distal) quando comparado ao lado de tensão (face mesial), considerando que este achado poderia estar relacionado à maior dificuldade de higienização da face distal dos caninos que estavam sendo movimentados.

Na Odontologia, os marcadores biológicos vêm sendo estudados com diferentes objetivos, entre eles detectar pacientes com alto risco de apresentar doença periodontal. Os marcadores biológicos estão presentes no FGC e aumentam significativamente durante o movimento dentário ortodôntico,^{36,76,78} quando elevações significativas nas concentrações destes mediadores da inflamação, tais como as citocinas e prostaglandinas, ocorrem temporariamente.¹⁴⁷ Desta forma, tem sido o objetivo de inúmeros estudos buscar mais conhecimento em fatores como a detecção precoce da propensão à reabsorção radicular, ou se o movimento dentário estaria causando uma inflamação maior do que a considerada normal, e ainda saber explicar de forma científica porque alguns pacientes apresentam uma maior velocidade de movimentação do que outros.

Os constituintes do fluido gengival crevicular vêm sendo estudados por ser uma forma não invasiva de detectar mediadores inflamatórios, o que facilitaria a utilização da técnica no cotidiano do profissional. De acordo com a literatura, os marcadores biológicos que apresentam maior potencial de serem utilizados no futuro no diagnóstico do movimento dentário ortodôntico são a Prostaglandina E₂, a Interleucina-1 β , Fator de Necrose Tumoral- α , Metaloproteinasas de Matriz como a MMP-8, Osteoprotegerina e fatores de reabsorção óssea como RANK e RANKL.¹⁷⁶

Segundo Grieve et al.,¹⁷¹ em um estudo feito com 10 pacientes ortodônticos, pode ser constatado, através da técnica de ELISA, que os níveis de IL-1 β e PGE₂ estiveram aumentados no fluido gengival de dentes sob movimentação, 1 hora e 24 horas após a aplicação da força. Após sete dias os níveis retornaram aos valores iniciais. Estes resultados demonstraram que os indutores de reabsorção óssea PGE₂ e IL-1 β , produzidos dentro do periodonto, são detectáveis no fluido gengival durante as fases iniciais do movimento dentário e retornaram aos valores iniciais após sete dias.¹⁷¹ Dudic et al.¹⁷⁷ também buscaram quantificar os níveis de IL-1 β e PGE₂ no fluido gengival após a utilização de elásticos de separação colocados na mesial dos primeiros molares superiores e inferiores. O fluido gengival foi coletado nos tempos -7 dias, 0, 1 minuto após, 1 hora, 1 dia e 7 dias. Os resultados mostraram que os níveis de IL-1 β e PGE₂ estiveram aumentados, tanto no lado de tensão como no de pressão, nos dentes com elástico. Nos dentes controle os níveis destes mediadores mantiveram-se nos mesmos patamares durante todo o experimento.¹⁷⁷

O efeito de forças leves e contínuas e forças interrompidas sobre os níveis de IL-1 β e PGE₂ foi avaliado em 10 pacientes submetidos à extração dos primeiros pré-molares e retração dos dentes caninos superiores. O fluido gengival foi coletado em 10 tempos durante três semanas. Os resultados mostraram que nos dentes que receberam forças leves e contínuas,

os níveis de IL-1 β e PGE₂ tiveram uma elevação significativa 24 horas após o início do movimento e depois decresceram. Nos dentes submetidos à força interrompida, mas que foi reativada a cada semana, os níveis de IL-1 β aumentaram 24 horas após o início e houve grande aumento 24 horas após a primeira reativação. Os níveis de PGE₂ aumentaram significativamente 24 horas após e permaneceram altos por uma semana. A sinergia entre a expressão de PGE₂ e IL-1 β e o tipo de força aplicada não foi evidente após uma semana do ensaio. Ambos os lados, com diferentes tipos de força, mostraram grande movimento comparados ao lado controle e não houve diferença entre os lados testados. Pode ser concluído que uma mecânica bem controlada, com reativações em tempos corretos, pode regular a secreção de IL-1 β , mas existem limitações no aumento destes mediadores em função de variações individuais.¹⁷⁸

Através da técnica de hibridização *in situ* as expressões do RNA mensageiro da IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram avaliadas após 3, 7 e 10 dias da aplicação da força ortodôntica. Pode ser observado que o estímulo mecânico induziu à síntese de IL-1 β e IL-6 com expressão máxima 3 dias após a aplicação da força e, a partir daí, os valores declinaram. A expressão do TNF- α não foi detectada tanto nos dentes testes como nos dentes controle durante o período de observação.¹⁴⁰

Karacay et al.¹⁷⁹ avaliaram os níveis de expressão do TNF- α no fluido gengival de dentes caninos sob duas diferentes técnicas de distalização, com forças contínuas e com forças pesadas intermitentes. A análise do fluido gengival foi feita com ELISA e os resultados demonstraram que a concentração de TNF- α teve um aumento não significativo após 24 horas e declinou acentuadamente após sete dias no grupo submetido à força contínua. A força pesada induziu rápida liberação de TNF- α e a resposta tecidual continuou por um período de tempo mais longo. Foi considerado que a força pesada deve ser cuidadosamente aplicada, para se prevenir de eventuais efeitos indesejáveis da liberação excessiva deste mediador.

A quantificação de três mediadores inflamatórios, prostaglandina PGE₂, Interleucina IL-6 e fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF) foi realizada em pacientes jovens e adultos sob movimentação ortodôntica. Foi coletado fluido gengival de incisivos laterais superiores submetidos ao movimento de inclinação labial com arco ortodôntico. A concentração de PGE₂ esteve significativamente elevada após 24 horas da aplicação da força nos pacientes juvenis e nos adultos, enquanto que a concentração de IL-6 e GM-CSF esteve aumentada apenas nos jovens. A quantidade total dos três mediadores no fluido gengival aumentou significativamente no tempo 24 horas nos dois grupos. Concluiu-se que no início do movimento dentário nos jovens, os níveis dos mediadores expressam maior

intensidade que nos adultos, o que estaria coerente com o fato de que o movimento dentário nos jovens é mais rápido que nos adultos, e inicia-se sem demora.¹⁸⁰

As variáveis velocidade e início do movimento dentário, e a quantificação das interleucinas IL-1 β e IL-1RA foram estudadas em seis pacientes em crescimento e quatro adultos. Os pacientes foram submetidos a exodontia de primeiros pré-molares e tiveram os dentes caninos superiores retraídos com arco segmentado, com diferentes intensidades de força. Foram empregados 18, 60, 120 e 240 gramas de força para retração dos caninos, distribuídos aleatoriamente pelos diferentes pacientes. Foi observado que houve diferenças entre os indivíduos na velocidade de translação dos caninos, mas ocorreu movimento com intensidade de força de 18 a 120 gramas. A demora na translação dentária foi observada nos caninos submetidos a 240 gramas de força. A velocidade de translação dentária foi significativamente maior nos pacientes em crescimento e esteve associada ao aumento na concentração de IL-1 β e IL-1RA.¹⁷²

Os níveis de substância P e IL-1 β no fluido gengival foram quantificados, através de ELISA, em nove pacientes submetidos à retração de dentes caninos. No experimento, foi utilizada uma força de 250 gramas derivada de elástico em cadeia. A coleta do FGC foi feita nos lados de pressão e tensão, antes do início da aplicação da força, após 1 hora, 4 horas, 8 horas, 72 horas, 120 horas e 168 horas. Após a ativação da força foram encontradas diferenças significativas entre os lados controle e teste. Os valores de substância P e IL-1 β estiveram maiores após 8, 24 e 72 horas. Entretanto, não houve diferença entre os lados controle e experimental no tempo 168 horas. Foi concluído que a substância P e a IL-1 β estariam envolvidas na inflamação periodontal como resposta ao estresse mecânico.⁷

Doze pacientes ortodônticos com necessidade de extração dos primeiros pré-molares tiveram os caninos retraídos com elásticos em cadeia, com 250 gramas de força, e os níveis de citocinas presentes no fluido gengival foram quantificados com ELISA. Os mediadores estudados foram as Interleucinas IL-1 β e IL-6, fator de necrose tumoral (TNF- α), fator de crescimento epidermal (EGF), e β_2 microglobulina. A concentração de todos os mediadores esteve aumentada 24 horas após a aplicação da força ortodôntica sugerindo que a alteração nos níveis das citocinas esteve associada com o processo de remodelação óssea necessária à movimentação dentária.¹⁸¹

Os níveis de IL-8 foram avaliados durante a aplicação de forças ortodônticas sobre dentes caninos superiores e inferiores em casos tratados com extrações de primeiros pré-molares. Os dentes superiores foram retraídos com força de 115 gramas e os inferiores com 90 gramas, com arcos segmentados. Os tempos de coleta do fluido gengival, nos lados de

tensão e pressão, foram imediatamente antes da aplicação da força, uma hora após a aplicação da força, 24 horas, 6 dias, 10 dias e 30 dias após a aplicação da força. Embora tenha havido um aumento na concentração de IL-8, analisado com o ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA), no lado de tensão após 1 hora, 24 horas, 6 dias e 10 dias, um declínio foi observado após 30 dias. O lado de pressão não demonstrou este aumento em qualquer período, exceto no tempo 10 dias. A concentração de IL-8, em ambos os lados, diminuiu e os valores se aproximaram no tempo 30 dias. A resposta tecidual à força ortodôntica parece aumentar os níveis de IL-8 nos estágios iniciais da movimentação.⁵

Os níveis no FGC de diversas enzimas também foram quantificados durante o movimento dentário ortodôntico. Um aumento nos níveis de lactato desidrogenase (LDH) no fluido gengival de dentes sob movimentação ortodôntica quando comparados aos dentes controle (sem movimentação) também foi relatado. Além disso, foram encontrados pequenos aumentos nos níveis de aspartato aminotransferase.⁸¹⁻⁸² A atividade da fosfatase alcalina (ALP) no sulco gengival também pode ser afetada pelas forças derivadas do tratamento ortodôntico e, nos dentes sob movimento, os níveis estavam significativamente elevados no lado de tensão comparados com o lado de compressão.⁸⁰

Ao empregar 100 gramas de força para retração dos dentes caninos, em casos tratados com extrações de primeiros pré-molares, puderam ser verificadas mudanças nos níveis da fosfatase alcalina no sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dias após o início da retração. O pico do aumento da atividade ocorreu no 14º dia, seguido de uma significativa queda, especialmente no lado de tensão.¹⁸²

É preciso considerar o fato de que o paciente ao estar utilizando acessórios ortodônticos pode contribuir para o aumento da placa bacteriana e inflamação gengival, que estaria relacionado ao aumento da atividade enzimática em todos os sítios.⁸¹⁻⁸² A limpeza dos dentes com aparelhagem ortodôntica é dificultada e a escovação pode ser auxiliada, em situações especiais como em pacientes que se submeteram a cirurgia ortognática, com um controle químico da placa bacteriana. O melhor produto para controle da gengivite, em pacientes ortodônticos, é a clorexidina. O gluconato de clorexidina a 0,12% é um importante agente terapêutico no controle da inflamação, sangramento gengival e acúmulo de placa em pacientes ortodônticos.¹⁸³⁻¹⁸⁴

Os níveis dos mediadores inflamatórios interleucina-1 β e da enzima β -glucuronidase (β G) foram quantificados no fluido do sulco gengival de pacientes sob expansão rápida da maxila. Quatro semanas antes da instalação do aparelho expensor Hyrax os pacientes receberam profilaxia, instruções de higiene oral e iniciaram bochechos com clorexidina. Os

pacientes foram observados antes da instalação do Hyrax ainda com elásticos de separação, a cada sete dias durante o período de ativação (21 dias) e mais uma semana, na fase de estabilização. O estudo demonstrou que os níveis dos mediadores inflamatórios diminuíram após o regime de controle de placa bacteriana e que forças ortodônticas leves (elásticos de separação) e pesadas (expansor) induziram aumento nos níveis de IL-1 β e β G no fluido gengival. Os achados sustentam a hipótese de que o estímulo mecânico causa uma reação inflamatória dentro dos tecidos periodontais, que por sua vez dispara o processo biológico associado com a remodelação óssea.¹⁸⁵

Bildt et al.¹⁸⁶ analisaram os níveis de diferentes MMPs em oito pacientes ortodônticos entre 10 e 18 anos com boa saúde periodontal. Dentes que não foram movimentados ortodonticamente foram utilizados como controle. Foram coletados FGC nos lados de tensão e pressão. O plano de tratamento ortodôntico foi específico para cada paciente e assim o dente coletado diferiu de caso para caso. As coletas foram feitas em uma visita normal de ativação ortodôntica, quando todos os dentes já estavam sob movimentação ortodôntica por um tempo médio de quatro semanas. As amostras foram analisadas utilizando-se a técnica de Western Blotting. Foram encontradas quantidades significativamente aumentadas de MMP-2 ativa e pro-MMP-2 nos dois lados experimentais quando comparados ao controle. Formas ativas de MMP-9 também estavam aumentadas de forma significativa no lado pressão em relação ao controle. MMP-1 também foi encontrada aumentada nos lados pressão e tensão em relação ao controle. Não foi possível detectar as MMPs 8 e 13 pela técnica utilizada.

Cantarella et al.³² utilizaram uma amostra de 11 pacientes ortodônticos com periodonto saudável, com média de idade de 13,9 anos e com necessidade de tratamento com exodontia de primeiros pré-molares. Todos os pacientes receberam instruções de higiene oral antes da montagem do aparelho ortodôntico. O canino superior esquerdo foi distalizado e utilizado como dente teste e o seu antagonista, sem aparelhagem ortodôntica, foi usado como controle. Foram feitas coletas de FGC na mesial e distal de cada dente teste e controle nos tempos 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas e 8 horas após aplicação da força ortodôntica. A amostra foi analisada pela técnica Western Blotting em busca de MMP-1 e MMP-2. Não foi possível detectar MMP-1 no FGC dos dentes controle. No lado pressão, foi encontrado aumento significativo de MMP-1 após uma hora que se manteve até três horas da aplicação da força, desaparecendo depois disso. No lado tensão também ocorreu aumento significativo de MMP-1 após uma hora e depois esses níveis foram caindo no decorrer do tempo. Os níveis de MMP-2 foram aumentando significativamente no lado pressão no decorrer do tempo,

chegando ao pico oito horas após a aplicação da força. No lado tensão os níveis de MMP-2 aumentaram significativamente após uma hora e gradualmente retornaram aos níveis iniciais.

Em um outro estudo envolvendo cinco pacientes ortodônticos com periodonto saudável, Ingman et al.³³ coletaram FGC para analisar a presença de MMP-1 e MMP-8. O FGC foi coletado do incisivo central superior, incisivo central inferior ou do canino superior imediatamente antes da ativação ortodôntica e a cada 24 horas após a ativação ortodôntica por um mês. Como controle, foram coletados FGC de um incisivo central superior de três mulheres que não estavam sendo submetidas a tratamento ortodôntico. Além disso, foram coletados FGC de pacientes que apresentavam gengivite e periodontite. Foram feitas análises de imunofluorometria e Western Blotting. A imunofluorometria revelou níveis de MMP-8 12 vezes mais altos em pacientes ortodônticos do que no controle, entretanto ainda mais baixos do que nos pacientes com gengivite e periodontite. A análise de Western Blotting também encontrou quantidade aumentada de MMP-8 no FGC dos pacientes ortodônticos comparado ao controle.

Este mesmo grupo de pesquisadores publicou um outro estudo⁶ no qual acompanharam 11 pacientes ortodônticos com periodonto saudável para analisar as concentrações de MMP-1 e MMP-8. Foram coletados FGC do incisivo central superior, incisivo central inferior ou do canino superior imediatamente antes da ativação ortodôntica e a cada hora por um período de 8 horas após a aplicação da força. Para o grupo controle, foram utilizados 6 pacientes saudáveis que não estavam sob tratamento ortodôntico e que foram submetidos a coletas de FGC do incisivo central superior a cada hora durante 8 horas. Foram feitas análises imunofluorométricas e Western Blotting. A concentração de MMP-8 no FGC dos pacientes ortodônticos estava significativamente mais alta entre 4 e 8 horas após a aplicação da força do que antes da ativação e também quando comparadas ao grupo controle. A MMP-1 não foi detectada pelas análises feitas.

Capelli et al.³⁴ utilizaram uma amostra de 14 pacientes ortodônticos com periodonto saudável e com necessidade de tratamento com exodontia de primeiros pré-molares. Todos os pacientes receberam instruções de higiene oral antes da montagem do aparelho ortodôntico e fizeram uso de bochecho de clorexidina durante o estudo. Os caninos superiores foram distalizados e utilizados como dentes testes. Como controle, foi utilizado apenas a medida feita antes da movimentação ser iniciada. As coletas de FGC foram feitas na mesial e distal para representar os lados de pressão e tensão. As coletas foram feitas uma semana antes da movimentação, quando foi iniciado o uso do bochecho de clorexidina, no momento da ativação, uma hora após a mesma e 1, 7, 14 e 21 dias após a ativação ortodôntica. A amostra

foi analisada pela técnica da multianálise imunoenzimática com microesferas em busca de MMP-3, -9 e -13 e foi encontrado mudanças significativas no lado pressão.

1.6 Inter-relação Ortodontia e Periodontia

O objetivo principal da terapia periodontal é restaurar e manter a saúde e a integridade do dente e do periodonto no qual ele se insere.¹⁸⁷ Em adultos, a perda de dentes ou do suporte periodontal pode resultar em migração patológica de um ou mais elementos dentários.¹⁸⁷ Isto pode resultar no aparecimento de diastemas inter-incisais, espaçamentos generalizados, projeção dos incisivos, rotação ou inclinação de pré-molares e molares com conseqüente colapso da oclusão posterior e perda da dimensão vertical. A terapia ortodôntica auxiliar ao tratamento periodontal é necessária para resolver estes problemas. A ortodontia pode facilitar a reabilitação oral agindo sobre problemas como dentes fraturados, inclinados, espaçamentos excessivos, espaço para pântico inadequado, incisivos extruídos e diastemas.¹⁸⁷

Quando um dente é movido ortodonticamente, todo o aparato periodontal, incluindo a estrutura óssea, ligamento periodontal e os tecidos moles, se move junto a ele.¹⁸⁸ Brown¹⁸⁹ observou a influência de verticalizar molares no periodonto de quatro pacientes. Sete meses após o início do tratamento, as bolsas periodontais associadas aos molares verticalizados tiveram uma redução de 2,5mm a mais do que os dentes controle. Também foi observado melhora na gengiva e menor acúmulo de placa. Outro estudo que acompanhou por 3,5 anos 22 pacientes que tiveram os molares inferiores verticalizados relatou que as bolsas na superfície mesial estavam menores nos dentes verticalizados do que nos dentes controle.¹⁹⁰

Re et al.¹⁹¹ acompanharam o tratamento ortodôntico de 267 pacientes adultos afetados por doença periodontal severa e migração patológica dos dentes anteriores. Foi relatado que apenas dois dentes foram extraídos durante o tratamento ortodôntico devido ao comprometimento periodontal, todos os pacientes terminaram com boa oclusão, função mastigatória restabelecida e melhora na estética devido ao realinhamento dos dentes anteriores. Os autores sugerem que força ortodôntica e movimento dentário dentro dos limites biológicos e em regiões saudáveis com periodonto reduzido não causa colapso periodontal. Os autores ainda afirmaram que o movimento de intrusão em periodonto saudável não resulta em diminuição das margens ósseas desde que a inflamação gengival seja controlada. É indicado o

uso de forças leves e que a linha de ação das forças passem perto do centro de resistência do dente a ser movimentado.

O tratamento ortodôntico de pacientes com doença periodontal controlada pode ser total ou parcial. O total é feito em apenas 10% dos adultos, seria um tratamento longo e com objetivos próximos do ideal. O parcial seria um tratamento mais curto e direcionado, buscando, por exemplo: facilitar o tratamento restaurador posicionando os dentes de forma a permitir técnicas mais conservadoras, ideais e estéticas; melhorar a saúde periodontal eliminando áreas de difícil higienização; estabelecer proporções coroa/raiz favoráveis e melhorar o posicionamento dentário para transmitir forças oclusais na direção do longo eixo.¹⁹²

O planejamento ortodôntico com objetivos ideais frequentemente não se aplica a pacientes com periodonto comprometido. Estes precisam de um tratamento objetivo e direcionado a resolver o seu problema de forma rápida e eficaz. Três fatores devem ser considerados neste momento:

- a) simplificação, ou seja, buscar mecânicas que favoreçam a higienização pelo paciente;
- b) metas, ou seja, avaliar qual seria o melhor resultado possível considerando estética, estabilidade e oclusão funcional. O paciente normalmente busca a melhora na estética e isto nem sempre leva a um resultado estável, devendo ser discutido com o paciente para que ambas as partes assumam um compromisso com o ponto onde pretendem chegar;
- c) custo/risco-benefício, conversar com o paciente sobre os benefícios do tratamento. Os custos envolvem não apenas o valor financeiro, mas também dor, desconforto, mobilidade dentária, e os riscos são vistos como a possibilidade de se criar um problema que não havia antes, como descalcificação, reabsorção radicular, problemas muco-gengivais e até mesmo perdas dentárias. Neste momento deve-se relatar também os riscos que o paciente corre caso escolha não fazer o tratamento.³⁶

Alguns fatores anatômicos que favorecem a retenção de placa como sulcos radiculares, defeitos no cimento, dentina ou esmalte e diversos outros fatores podem desempenhar uma importante função no desequilíbrio das atividades do hospedeiro e parasita em favor da destruição periodontal em sítios específicos.³⁶

A presença dos dispositivos ortodônticos em proximidade com a gengiva favorece o acúmulo de placa e a dificuldade na higienização, o que pode levar a um processo

inflamatório. Os efeitos vistos clinicamente podem contribuir para infecção crônica, hiperplasia inflamatória, recessão gengival, perda irreversível de inserção (perda óssea) e acúmulo excessivo de tecido. Entretanto, estes efeitos podem ser minimizados por um planejamento correto e reforço na higiene.¹⁹³ Adolescentes com aparelho fixo que são frequentemente cobrados em relação a escovação podem apresentar níveis de placa iguais ou melhores do que adolescentes da mesma faixa etária sem aparelhagem ortodôntica.¹⁹⁴

Movimentos de inclinação podem levar placa supragengival para subgengival podendo resultar numa bolsa periodontal e defeito infra-ósseo.¹⁹⁵

O ortodontista deve se precaver quando a gengiva se mostra muito fina, pois existe o risco de que movimentos labiais estejam associados com recessão gengival. Os incisivos inferiores são os mais sujeitos à recessão devido à tábua óssea muito fina e devido ao posicionamento labial destes. Forças excessivas podem causar recessão localizada em dentes com gengiva inserida inadequada, mas esta associação é imprevisível e a relação causa-consequência ainda é inconclusiva.¹⁹⁶⁻¹⁹⁷

Trauma, inflamação gengival exacerbada ou deiscência do osso alveolar podem resultar em recessão gengival e perda de inserção, gerando problemas na estética, sensibilidade, perda de suporte periodontal, dificuldades em manter a higiene e aumento da susceptibilidade a cáries.¹⁹⁸

As bandas ortodônticas devem ser bem adaptadas e os bráquetes colados com cuidadosa remoção do excesso de resina. É preferível a utilização de aparelhos simples, fáceis de higienizar, para evitar que ocorra um crescimento da gengiva, mais comum nos dentes posteriores, devido à irritação mecânica das bandas, irritação química produzida pelo cimento usado nas bandas, impacção alimentar devido à proximidade do arco do tecido mole e devido à higiene deficiente.¹⁹³

O fechamento dos espaços de extrações frequentemente resulta em acúmulo de tecido gengival e aumento da papila interdental. Este acúmulo tecidual pode resultar em dificuldade de controle da placa e reabertura dos espaços.¹⁹⁹

As causas da reabsorção radicular vêm sendo exaustivamente estudadas e ainda não se tem uma resposta definida.²⁰⁰⁻²⁰¹ Sabe-se que não se deve usar forças excessivas e que é importante ter sempre um controle radiográfico das raízes no decorrer do tratamento. Em um paciente com periodonto comprometido isto é ainda mais importante, pois pequenas reabsorções em um periodonto saudável podem não ser clinicamente significativas, mas somadas a perda de inserção devido ao processo inflamatório podem comprometer a longevidade do dente.²⁰⁰⁻²⁰¹

Durante o tratamento ortodôntico de pacientes com história de doença periodontal é essencial que qualquer sinal de perda de inserção seja diagnosticado e tratado imediatamente. Alguns indivíduos podem ser afetados por uma doença agressiva e perder até 5mm de inserção em apenas dois meses. É inegável que danos irreversíveis podem ocorrer entre duas consultas e assim a qualquer sinal de atividade de doença periodontal persistente o tratamento ortodôntico deve ser interrompido.³⁶

Entretanto, todas essas observações sobre o tratamento ortodôntico de pacientes periodontais foram feitas a partir de observações clínicas e relatos de caso. Não foi encontrado nenhum estudo sobre a influência do tratamento ortodôntico na patogênese da doença periodontal.

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo tem como proposta analisar o fluido gengival crevicular de incisivos com doença periodontal controlada submetidos à movimentação ortodôntica, tendo como objetivos específicos:

- a) quantificar, em diferentes intervalos de tempo, as alterações no volume do fluido gengival;
- b) quantificar a presença das metaloproteinases da matriz - MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-12 e MMP-13.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Seleção da amostra

A amostra desta pesquisa constituiu-se de 10 pacientes com doença periodontal controlada oriundos da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (FO-UERJ) e da Faculdade de Odontologia da Universidade Estácio de Sá. Estes pacientes foram encaminhados para tratamento ortodôntico na clínica do curso de especialização em Ortodontia da FO-UERJ. A amostra consistiu de oito mulheres e dois homens, sendo oito melanodermas e dois caucasianos e a média de idade (\pm DP) foi de $46,2 \pm 10,4$ anos.

Todos os participantes do estudo eram portadores de periodontite crônica ou agressiva de acordo com a Academia Americana de Periodontia (AAP) de 1999, com pelo menos seis sítios com profundidade de bolsa maior ou igual a 5mm antes do tratamento periodontal. Os critérios de inclusão foram estar com a doença periodontal controlada com liberação do periodontista para tratamento ortodôntico, possuir um mínimo de 15 dentes, apresentar incisivos projetados com necessidade de retração ortodôntica e evidência radiográfica de perda óssea (Figura 1). Os pacientes deveriam estar com boa saúde geral e eram excluídos em caso de serem fumantes ou se houvesse relato de alguma condição sistêmica que influenciasse no decorrer da doença periodontal ou no tratamento da mesma. Pacientes que tivessem feito uso de antibióticos ou anti-inflamatórios no mês antecedente ao estudo ou que estivessem grávidas ou amamentando também eram excluídos do estudo.⁸⁰



Figura 1 – Caracterização da amostra utilizada no estudo

Nota: Fotos intraorais de três pacientes com doença periodontal controlada, incisivos projetados labialmente com perda de inserção e espaçamentos.

Este protocolo, incluindo os exames clínicos, o tratamento ortodôntico e a coleta de fluido gengival crevicular (FGC), foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto (1949-CEP/HUPE - Anexo). Todos os participantes assinaram um termo de consentimento informado antes do início do estudo.

3.2 Procedimentos clínicos

Sete dias antes do início do movimento ortodôntico, todos os pacientes receberam instruções de higiene bucal demonstrando o correto uso da escova de dentes e do fio dental e receberam um kit com dentifrício (Colgate Total® 12, Colgate-Palmolive, São Paulo, SP, Brasil), escova de dente (Oral B, Procter & Gamble, São Paulo, SP, Brasil), fio dental e bochecho de Gluconato de Clorexidina 0,12% (Noplak®, Daudt Oliveira Laboratory, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Todos foram instruídos a bochechar duas vezes ao dia com 15ml da solução por 30 segundos durante toda a duração do estudo (28 dias). Neste mesmo dia (dia -7) foram instalados os brackets ortodônticos na arcada superior de cinco pacientes e na arcada inferior dos outros cinco pacientes para garantir uma distribuição igual de sítios movimento e controle em ambas as arcadas. A escolha da arcada a ser movimentada e a arcada controle era feita de acordo com o que a má-oclusão do paciente permitia. Amostras de fluido gengival

crevicular foram coletadas nas faces palatinas/linguais de um incisivo central e um incisivo lateral de cada arcada (preferencialmente dos elementos dentários 11, 12, 41 e 42), resultando em um total de quatro amostras por paciente. Estes sítios foram selecionados para representar o lado pressão das forças aplicadas (sítios movimento). As amostras obtidas da arcada sem braquetes foram usadas como controle.

No dia 0, o aparelho ortodôntico foi ativado para iniciar a retração dos incisivos projetados. O plano de tratamento ortodôntico era específico para cada paciente, mas todos envolviam aparelho ortodôntico fixo e para iniciar o alinhamento foi utilizado um arco de aço multifilamentado de calibre 0,0155 (Highland Metals Inc. San Jose CA, USA) com dobras em forma de ômega amarradas em *tie back*, criando zonas de pressão na face palatina/lingual dos incisivos e zonas de tensão na face vestibular dos mesmos. Nova amostra de fluido gengival crevicular foi coletada após a ativação ortodôntica (tempo 0) e após 1h, 24h, 7 dias, 14 dias e 21 dias da ativação ortodôntica (visitas 1h, 24h, 7d, 14d e 21d respectivamente). A presença ou ausência de placa (IP) e sangramento a sondagem (IS) foram avaliadas em 6 sítios por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual e distolingual) nas visitas -7d, 0, 24h, 7d, 14d e 21d (Figura 2).

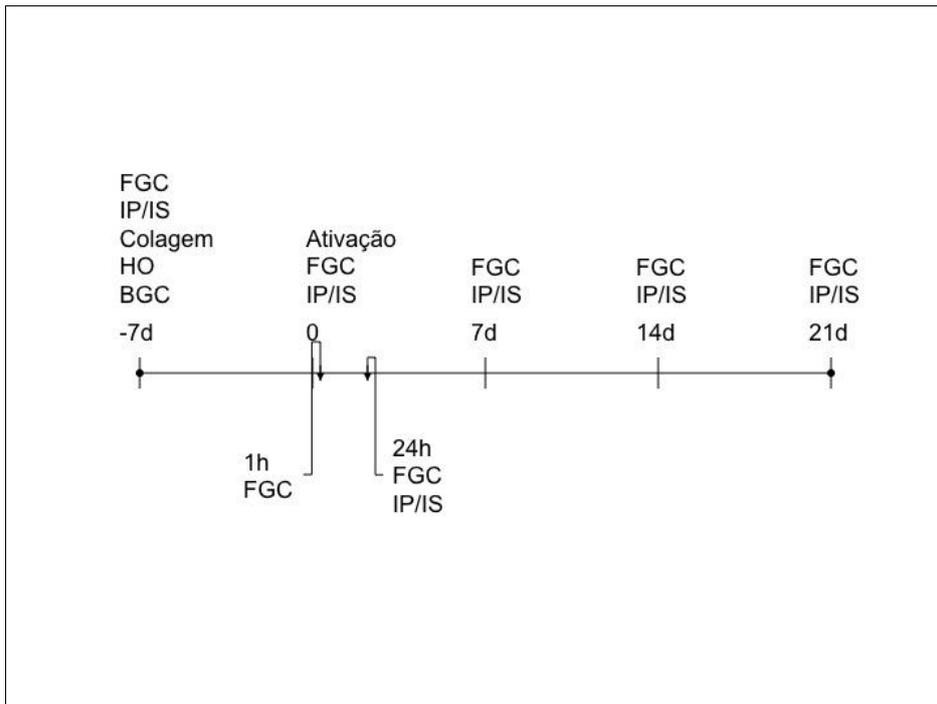


Figura 2 – Desenho da sequência do estudo

Nota: Uma semana antes da movimentação ortodôntica (-7d), foi coletado o fluido gengival crevicular (FGC) de todos os pacientes da amostra; foi feita análise do índice de placa (IP) e sangramento a sondagem (IS); o aparelho ortodôntico fixo foi montado (colagem); os pacientes foram instruídos sobre como proceder com a higiene oral (HO); além da prescrição do bochecho de Gluconato de Clorexidina 0,12% por 28 dias (BGC). No dia 0, o aparelho ortodôntico foi ativado, foi coletado novamente amostras de FGC e analisados os parâmetros clínicos. Amostras de FGC foram coletadas 1 hora, 24 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias após a ativação do aparelho ortodôntico (visitas 1h, 24h, 7d, 14d e 21d respectivamente). Os parâmetros clínicos também foram analisados nas visitas 24h, 7d, 14d e 21d.

3.3 Coleta de fluido gengival crevicular

Antes da coleta do FGC, a placa supragengival era cuidadosamente removida, os sítios a serem coletados eram isolados com roletes de algodão e secos com leves jatos de ar. As coletas eram então feitas com o uso de tiras de papel absorventes (Periopaper®, Interstate Drug Exchange, Amityville, NY, USA), que eram inseridas 1 a 2mm no crevículo gengival e mantidas por 30 segundos (Figura 3). Amostras contaminadas com sangue eram descartadas e nova coleta era feita alguns minutos depois no mesmo sítio. O volume de FGC em cada tira era medido através de um medidor de FGC calibrado (Periotron 8000®, Oraflow Inc., Plainview, NY, USA), e cada tira era então transferida para um tubo plástico selado do tipo

Eppendorf e armazenado à temperatura de -20°C até o envio ao laboratório de Periodontia do *Forsyth Institute*, Boston, EUA onde foram armazenados à temperatura de -80°C até o ensaio.

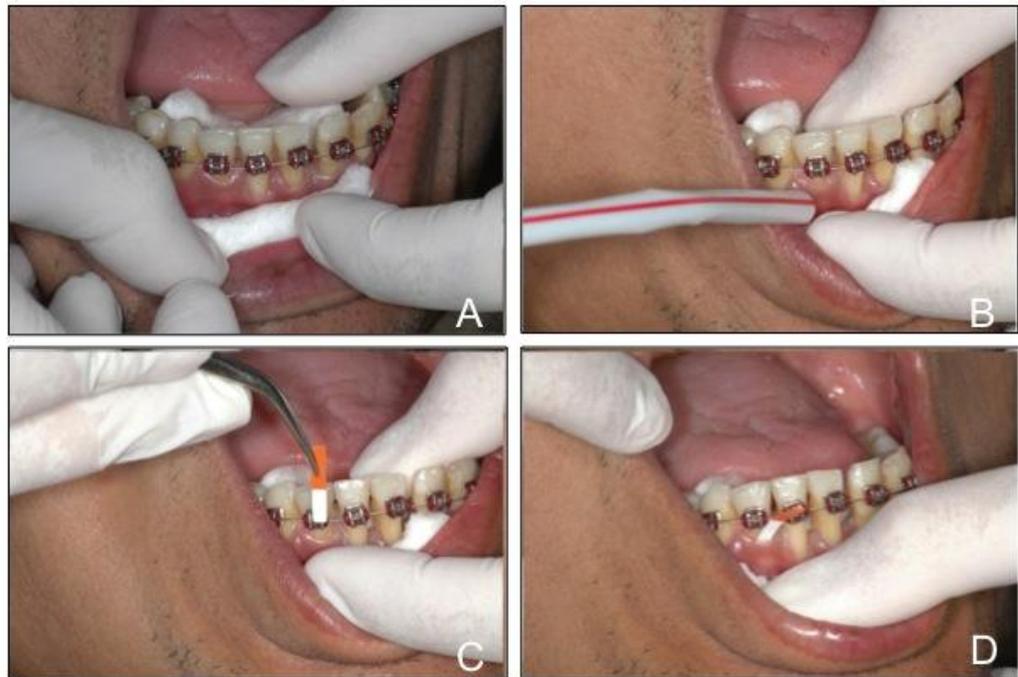


Figura 3 – Técnica de coleta do FGC.

Legenda: A - Isolamento relativo com roletes de algodão; B - secagem com leves jatos de ar; C - inserção da tira de papel absorvente com o uso de uma pinça de algodão e; D - manutenção desta tira no sulco gengival por 30 segundos.

3.4 Análise laboratorial

Níveis de MMP-1, -2, -3, -7, -8, -12 e -13 foram determinados através da técnica de multianálise imunoenzimática com microesferas e um kit disponível comercialmente (Human 7-Plex MMP Fluorokine® MultiAnalyte Profiling [R&D Systems, Minneapolis, MN, USA]). Antes do ensaio, o fluido gengival crevicular foi extraído da tira de papel absorvente através da imersão de cada tira em $60\mu\text{l}$ de solução tampão fornecida pelo kit. As amostras eram então postas em um agitador orbital, tipo Vortex, por 30 minutos, centrifugadas em $9.300g$ por 10 minutos e todo o sobrenadante era usado no ensaio, representando o conteúdo de 1

sítio. O ensaio foi conduzido de acordo com as instruções do fabricante; placas com 96 poços com filtro foram pré-molhadas com solução tampão de lavagem e a solução foi aspirada dos poços usando uma bomba de vácuo (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Microesferas cobertas com anticorpos monoclonais contra os 7 alvos pesquisados foram adicionadas aos poços. As amostras e o padrão foram pipetadas nos poços e incubadas a 4°C por 24 horas. Os limites superiores e inferiores das curvas padrão variaram de acordo com as diferentes MMPs sendo mensuradas, sendo que o limite mais baixo detectado foi de 11pg/ml para MMP-1 e o mais alto foi de 74.500pg/ml para MMP-7. Os poços foram lavados usando a bomba a vácuo e uma mistura de anticorpos secundários biotinizados foi adicionada. Após incubação por uma hora, foi adicionado Estreptavidina conjugada à proteína fluorescente, R-phycoerythrin (Streptavidin-RPE) e foi incubada por mais 30 minutos. Após nova lavagem para remover reagentes não ligados, foi adicionado fluido envolvente aos poços e as microesferas foram submetidas ao analisador de microesferas (Luminex 100TM, Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA, USA). A concentração das amostras não conhecidas (antígenos das amostras de FGC) foram estimadas das curvas padrão usando um software comercial (Prism 5 para Windows, versão 5.04, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) e os níveis de MMP foram expressos como a quantidade total (pg) por sítio.

3.5 Análise estatística

Os dados disponíveis de cada paciente incluíam a presença ou ausência de placa e sangramento a sondagem para todos os sítios presentes, volume de FGC em µl e os níveis (pg/sítio) de MMP-1, -2, -3, -7, -8, -12, e -13 para 4 sítios por paciente (2 sítios movimento e 2 controle) para cada intervalo analisado (-7d, 0, 1h, 24h, 7d, 14d e 21d). Valores médios foram calculados para cada paciente e somando todos os pacientes, para cada tempo analisado e em cada grupo clínico separadamente. O teste de normalidade D'Agostino & Pearson foi usado para determinar se os dados tinham distribuição normal e os resultados estão expostos nas tabelas 1 a 14. O teste ANOVA foi usado para avaliar se havia diferença estatisticamente significativa nas médias dos dados clínicos no decorrer dos tempos analisados. O teste de Friedman foi usado para avaliar se havia diferença estatisticamente significativa no volume de FGC e nos níveis de MMPs no decorrer dos tempos em cada grupo separadamente. Além

disso, para o volume de FGC e níveis de MMPs, foi usado o teste Mann-Whitney para avaliar diferenças entre os grupos em cada intervalo analisado.

4 RESULTADOS

4.1 Índice de placa e sangramento à sondagem durante o movimento dentário ortodôntico

O Gráfico 1 mostra a média em porcentagem dos sítios positivos para placa e sangramento à sondagem para toda a amostra em cada intervalo de tempo. Os resultados do teste ANOVA revelaram que ambos os parâmetros clínicos tiveram uma redução estatisticamente significativa no decorrer do tempo ($p < 0,001$), a média ($\pm DP$) do índice de placa reduziu de $48\% \pm 17,3$ para $17\% \pm 10,2$ do dia -7 ao dia 21. Este dado indica que o controle de higiene oral foi capaz de reduzir o acúmulo de placa e a inflamação gengival a níveis mínimos.

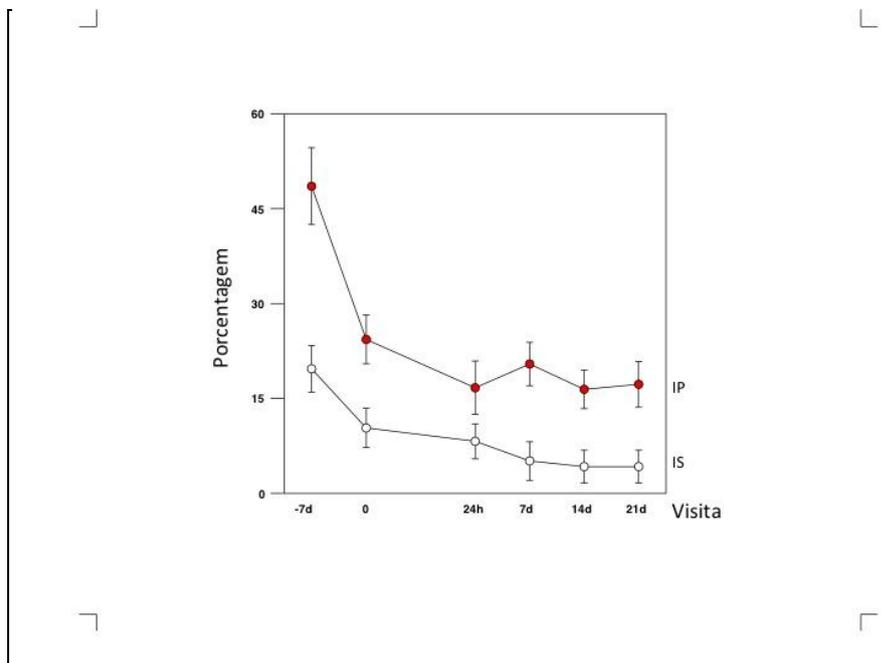


Gráfico 1 – Médias das porcentagens dos sítios com sangramento a sondagem (IS) e placa (IP) nos dias -7; no dia da ativação ortodôntica; 24 horas; 7 dias; 14 dias; e 21 dias após o início da movimentação ortodôntica (visitas -7d, 0, 24h, 7d, 14d e 21d respectivamente)

Nota: Os círculos representam os valores médios e os traços representam o desvio padrão da média. As diferenças significativas no decorrer do tempo foram calculadas usando o teste ANOVA.

4.2 Mudanças no volume de FGC durante o movimento dentário ortodôntico

O Gráfico 2 apresenta a mediana e o intervalo interquartílico do volume de FGC (μl) para os dois grupos clínicos em cada intervalo de tempo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no decorrer do tempo para nenhum dos grupos. Quando os dois grupos foram comparados também não foram encontradas nenhuma diferença estatisticamente significativa nos tempos analisados.

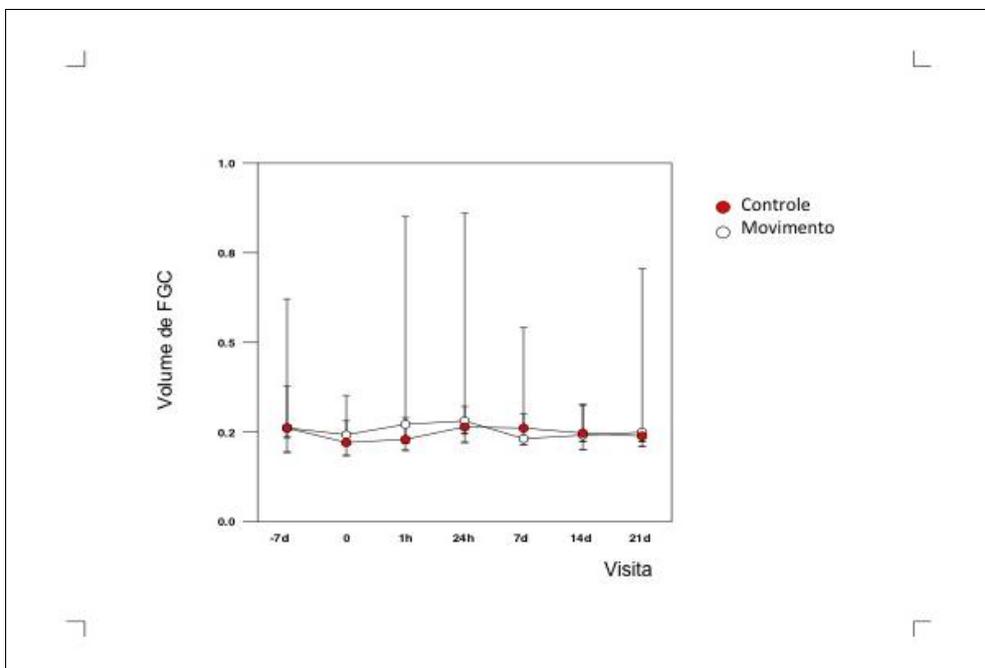


Gráfico 2 – Medianas e intervalos interquartílicos do volume de FGC nos dois grupos nos dias -7; no dia da ativação do aparelho ortodôntico; 1 hora; 24 horas; 7 dias; 14 dias e 21 dias após o início do movimento ortodôntico (visitas -7d, 0, 1h, 24h, 7d, 14d e 21d respectivamente)

Nota: Os círculos (vermelho simbolizando o grupo controle e branco o grupo movimento) representam os valores medianos e os traços representam os intervalos interquartílicos de 25 e 75%. As diferenças significativas no decorrer do tempo foram calculadas usando o teste de Friedman e as diferenças entre os grupos em cada intervalo de tempo foram calculadas usando o teste de Mann-Whitney. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no decorrer do tempo nem entre os grupos em nenhum intervalo de tempo.

4.3 Mudanças nos níveis de MMPs no FGC durante o movimento dentário ortodôntico

Um total de 280 amostras de FGC (10 pacientes x 4 sítios x 7 tempos) foram analisadas para detecção dos níveis de 7 MMPs. A amplitude dinâmica da técnica de multianálise imunoenzimática com microesferas empregada neste estudo permitiu a quantificação das MMPs analisadas na maioria das amostras testadas. As frequências de detecção das MMPs -1, -2, -3, -7, -8, -12 e -13 foram de 93%, 98%, 99%, 76%, 100%, 100% e 80% respectivamente.

A estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartil, média, desvio padrão, intervalo de confiança e valores de p do teste de normalidade D'Agostino e Pearson referentes aos níveis de metaloproteinases de matriz nos diferentes intervalos de tempo analisados nos grupos controle e movimento estão expressos nas Tabelas 1 a 14, a seguir.

Tabela 1 – Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartil, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo controle uma semana antes do início da ativação ortodôntica (dia -7)

	MMP 1	MMP 12	MMP 13	MMP 2	MMP 3	MMP 7	MMP 8
N	10	10	10	10	10	10	10
Valor mínimo	0,77	2,27	1,99	4,32	0,76	0,71	496,6
Valor máximo	19,46	28,27	47,82	47,94	6,93	14,31	4490
Mediana	2,76	10,04	9,44	14,66	1,83	4,58	2335
Percentil 25	1,40	3,69	4,16	7,50	1,02	2,29	1034
Percentil 75	7,31	24,49	17,01	25,54	2,70	8,07	3350
Média	5,36	13,57	13,41	18,03	2,28	5,48	2283
Desvio Padrão	5,93	9,95	13,83	13,07	1,82	4,33	1241
ICI	1,11	6,45	3,52	8,67	0,97	2,38	1395
ICS	9,60	20,69	23,31	27,38	3,58	8,58	3170
Valor de P	0,0059	0,2577	0,0016	0,0445	0,0006	0,2778	0,9063

Tabela 2 – Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartilico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo movimento uma semana antes do início da ativação ortodôntica (dia -7)

	MMP 1	MMP 12	MMP 13	MMP 2	MMP 3	MMP 7	MMP 8
N	10	10	10	10	10	10	10
Valor mínimo	0,27	1,22	1,45	1,10	0,69	0,47	378,30
Valor máximo	7,98	14,73	30,49	92,17	65,00	23,00	3350
Mediana	1,24	3,73	3,83	14,73	1,94	3,09	1399
Percentil 25	0,52	1,47	1,87	4,96	0,83	1,12	486,50
Percentil 75	1,99	10,98	8,85	22,59	10,21	12,91	2821
Média	1,83	6,06	7,24	20,49	10,96	6,31	1604
Desvio Padrão	2,25	5,20	8,75	26,58	21,19	7,56	1185
ICI	0,22	2,33	0,98	1,47	-4,20	0,89	756,30
ICS	3,44	9,78	13,51	39,50	26,12	11,72	2452
Valor de P	<0,0001	0,2351	<0,0001	<0,0001	0,0003	0,0570	0,3457

Tabela 3 – Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartilico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo controle no dia da ativação do aparelho ortodôntico (dia 0)

	MMP 1	MMP 12	MMP 13	MMP 2	MMP 3	MMP 7	MMP 8
N	10	10	10	10	10	10	10
Valor mínimo	0,51	1,18	2,08	2,53	0,28	0,19	129,6
Valor máximo	6,09	19,91	38,90	30,01	4,87	20,06	4060
Mediana	1,59	6,17	5,67	11,78	1,25	3,84	1785
Percentil 25	0,78	3,32	3,71	5,01	0,46	1,85	1041
Percentil 75	3,09	10,97	11,07	14,73	2,61	5,08	2806
Média	2,18	7,59	9,97	11,87	1,72	4,92	1889
Desvio Padrão	1,75	6,03	11,54	7,90	1,46	5,67	1153
ICI	0,92	3,28	1,71	6,21	0,68	0,86	1065
ICS	3,43	11,91	18,22	17,52	2,77	8,98	2714
Valor de P	0,0811	0,2146	0,0006	0,0478	0,1458	<0,0001	0,8083

Tabela 4 – Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartilico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo movimento no dia da ativação do aparelho ortodôntico (dia 0)

	MMP 1	MMP 12	MMP 13	MMP 2	MMP 3	MMP 7	MMP 8
N	10	10	10	10	10	10	10
Valor mínimo	0,21	1,67	0,99	3,70	0,32	0,88	318,70
Valor máximo	7,69	38,93	18,61	86,36	18,39	38,55	3350
Mediana	1,74	9,84	4,63	10,59	1,61	2,69	1506
Percentil 25	0,74	4,44	2,40	6,00	0,60	2,13	778
Percentil 75	3,34	17,23	11,42	16,84	2,13	9,12	2587
Média	2,48	12,85	6,79	17,74	3,04	7,42	1702
Desvio Padrão	2,49	11,89	5,58	24,60	5,43	11,43	1093
ICI	0,70	4,34	2,79	0,14	-0,84	-0,75	919,9
ICS	4,26	21,35	10,78	35,34	6,92	15,59	2484
Valor de P	0,0506	0,0495	0,1954	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,4969

Tabela 5 – Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartilico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo controle uma hora após a ativação do aparelho ortodôntico (1h)

	MMP 1	MMP 12	MMP 13	MMP 2	MMP 3	MMP 7	MMP 8
N	10	10	10	10	10	10	10
Valor mínimo	0,75	2,08	0,51	2,63	0,17	0,55	630,70
Valor máximo	5,14	11,54	34,00	24,53	4,79	29,69	3950
Mediana	2,25	5,75	2,95	9,98	1,52	3,13	1962
Percentil 25	0,82	2,53	2,25	6,61	0,81	1,26	750,90
Percentil 75	3,52	8,55	11,95	18,17	2,54	11,78	2729
Média	2,41	5,81	7,86	11,78	1,84	7,46	1961
Desvio Padrão	1,58	3,32	10,62	6,76	1,48	9,08	1128
ICI	1,28	3,43	0,26	6,94	0,78	0,96	1154
ICS	3,54	8,18	15,46	16,62	2,90	13,96	2769
Valor de P	0,5146	0,5972	0,0016	0,6139	0,1880	0,0033	0,7639

Tabela 6 – Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartilico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo movimento uma hora após a ativação do aparelho ortodôntico (1h)

	MMP 1	MMP 12	MMP 13	MMP 2	MMP 3	MMP 7	MMP 8
N	10	10	10	10	10	10	10
Valor mínimo	0,69	3,77	0,60	4,59	0,35	0,98	693,70
Valor máximo	4,20	21,06	16,98	48,94	14,83	31,69	3456
Mediana	1,71	8,01	2,08	10,70	0,98	5,08	2225
Percentil 25	0,92	5,64	1,56	8,06	0,76	1,75	1178
Percentil 75	2,25	11,85	3,39	13,52	2,90	7,62	3350
Média	1,84	9,49	3,66	13,94	2,91	7,24	2278
Desvio Padrão	1,05	5,27	4,76	12,80	4,60	9,05	1081
ICI	1,08	5,72	0,26	4,78	-0,37	0,76	1505
ICS	2,59	13,27	7,07	23,10	6,20	13,72	3052
Valor de P	0,0581	0,0602	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,3287

Tabela 7 – Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartilico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo controle 24 horas após a ativação do aparelho ortodôntico (24h)

	MMP 1	MMP 12	MMP 13	MMP 2	MMP 3	MMP 7	MMP 8
N	10	10	10	10	10	10	10
Valor mínimo	0,90	1,50	0,41	4,16	0,28	1,40	265,60
Valor máximo	24,09	29,45	29,91	45,25	28,88	33,80	3350
Mediana	4,54	6,77	5,60	12,85	4,67	3,97	1888
Percentil 25	1,98	4,35	1,82	5,25	0,83	1,80	846,90
Percentil 75	9,47	11,90	10,49	21,63	7,91	6,50	2621
Média	6,82	9,38	7,88	15,46	6,61	6,91	1769
Desvio Padrão	7,01	8,13	8,87	12,62	8,50	9,69	1078
ICI	1,80	3,55	1,53	6,43	0,53	-0,02	997,50
ICS	11,84	15,20	14,23	24,49	12,69	13,85	2541
Valor de P	0,0027	0,0025	0,0015	0,0121	0,0001	<0,0001	0,4375

Tabela 8 – Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartilico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo movimento 24 horas após a ativação do aparelho ortodôntico (24h)

	MMP 1	MMP 12	MMP 13	MMP 2	MMP 3	MMP 7	MMP 8
N	10	10	10	10	10	10	10
Valor mínimo	0,26	1,37	0,47	4,84	1,22	1,48	216,60
Valor máximo	25,98	26,22	19,23	80,56	29,30	51,10	3350
Mediana	5,52	16,90	3,72	10,73	1,67	4,69	2296
Percentil 25	1,58	13,19	1,95	7,46	1,29	2,47	948,30
Percentil 75	12,16	19,31	8,15	16,38	3,88	8,88	3108
Média	8,22	15,63	5,87	17,52	4,93	9,77	2050
Desvio Padrão	8,94	7,09	6,10	22,47	8,68	14,96	1188
ICI	1,82	10,56	1,50	1,44	-1,27	-0,93	1200
ICS	14,63	20,70	10,24	33,59	11,14	20,47	2900
Valor de P	0,1094	0,2192	0,0361	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,4342

Tabela 9 – Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartilico, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo controle uma semana após a ativação do aparelho ortodôntico (7d)

	MMP 1	MMP 12	MMP 13	MMP 2	MMP 3	MMP 7	MMP 8
N	10	10	10	10	10	10	10
Valor mínimo	0,57	1,60	2,69	5,59	0,37	0,85	413
Valor máximo	19,90	31,76	26,23	41,81	4,37	13,59	3887
Mediana	3,64	14,64	7,75	9,03	1,47	5,50	1675
Percentil 25	2,32	10,08	5,02	7,88	0,91	2,23	808,9
Percentil 75	14,59	15,34	14,56	32,30	3,38	8,75	2795
Média	7,53	13,84	10,07	16,74	2,09	6,05	1856
Desvio Padrão	7,20	8,05	7,20	13,58	1,39	4,31	1183
ICI	2,38	8,08	4,91	7,02	1,09	2,96	1010
ICS	12,68	19,60	15,22	26,46	3,09	9,14	2702
Valor de P	0,3250	0,1137	0,0412	0,2579	0,3477	0,5135	0,5699

Tabela 10 – Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartil, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo movimento uma semana após a ativação do aparelho ortodôntico (7d)

	MMP 1	MMP 12	MMP 13	MMP 2	MMP 3	MMP 7	MMP 8
N	10	10	10	10	10	10	10
Valor mínimo	1,00	3,28	0,71	5,01	0,39	1,22	665,50
Valor máximo	16,65	31,16	22,76	94,06	39,03	11,30	3350
Mediana	3,99	6,48	4,32	10,23	1,15	4,23	1967
Percentil 25	1,74	4,42	1,64	5,28	0,72	2,65	803,30
Percentil 75	7,15	15,46	11,40	25,01	11,03	7,34	3350
Média	5,22	10,29	7,19	21,40	8,57	5,13	1996
Desvio Padrão	4,77	9,28	7,76	28,61	15,43	3,25	1139
ICI	1,81	3,64	1,64	0,93	-2,46	2,81	1181
ICS	8,64	16,94	12,76	41,87	19,61	7,46	2811
Valor de P	0,0093	0,0230	0,0972	0,0004	0,0235	0,2934	0,1058

Tabela 11 – Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartil, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo controle duas semanas após a ativação do aparelho ortodôntico (14d)

	MMP 1	MMP 12	MMP 13	MMP 2	MMP 3	MMP 7	MMP 8
N	10	10	10	10	10	10	10
Valor mínimo	0,21	1,84	0,20	2,40	0,20	0,48	87,26
Valor máximo	18,55	39,48	30,08	65,61	10,37	22,87	3350
Mediana	7,03	14,91	7,21	15,08	1,79	5,54	1541
Percentil 25	3,17	2,50	3,53	6,47	0,73	1,03	771,10
Percentil 75	9,63	32,04	10,70	27,84	4,32	17,33	2647
Média	6,97	16,79	8,87	19,82	3,02	8,05	1694
Desvio Padrão	5,31	14,59	8,28	18,56	3,31	8,29	1115
ICI	3,16	6,35	2,94	6,54	0,65	2,11	896,80
ICS	10,77	27,22	14,80	33,10	5,39	13,99	2491
Valor de P	0,1768	0,2464	0,0005	0,0028	0,0323	0,3468	0,3247

Tabela 12 – Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartil, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo movimento duas semanas após a ativação do aparelho ortodôntico (14d)

	MMP 1	MMP 12	MMP 13	MMP 2	MMP 3	MMP 7	MMP 8
N	10	10	10	10	10	10	10
Valor mínimo	0,24	1,07	0,17	2,83	0,41	0,98	219,20
Valor máximo	14,12	25,83	14,45	58,68	33,66	33,66	3350
Mediana	3,32	9,36	3,95	8,28	1,99	2,62	1708
Percentil 25	0,98	2,20	0,75	5,12	0,71	1,38	486
Percentil 75	7,66	19,63	8,66	19,08	4,03	5,82	2611
Média	4,38	11,59	5,22	14,49	5,23	6,24	1608
Desvio Padrão	4,41	9,29	4,93	16,66	10,11	10,03	1168
ICI	1,23	4,93	1,69	2,56	-1,99	-0,92	772,90
ICS	7,54	18,24	8,75	26,41	12,47	13,42	2444
Valor de P	0,0924	0,4991	0,3631	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,3205

Tabela 13 – Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartil, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo controle três semanas após a ativação do aparelho ortodôntico (21d)

	MMP 1	MMP 12	MMP 13	MMP 2	MMP 3	MMP 7	MMP 8
N	10	10	10	10	10	10	10
Valor mínimo	0,47	2,46	1,05	3,08	0,49	0,85	227
Valor máximo	11,94	35,21	21,07	36,13	9,49	12,11	3776
Mediana	3,52	4,38	4,37	14,80	1,42	3,89	2583
Percentil 25	1,30	3,65	3,20	6,25	0,90	1,37	513
Percentil 75	5,41	18,69	11,25	20,58	1,98	5,51	3072
Média	4,20	10,79	7,10	15,53	2,15	4,22	2135
Desvio Padrão	3,61	10,66	6,20	10,06	2,63	3,32	1278
ICI	1,62	3,15	2,66	8,32	0,27	1,84	1221
ICS	6,78	18,42	11,54	22,72	4,04	6,60	3050
Valor de P	0,0777	0,0310	0,0456	0,3318	<0,0001	0,0131	0,4177

Tabela 14 – Estatística descritiva com valores mínimo, máximo, mediana, intervalo interquartil, média, desvio padrão, intervalo de confiança com limites inferiores a 95% (ICI) e superiores a 95% (ICS) e valor de P dos níveis de MMPs encontrados no grupo movimento três semanas após a ativação do aparelho ortodôntico (21d)

	MMP 1	MMP 12	MMP 13	MMP 2	MMP 3	MMP 7	MMP 8
N	10	10	10	10	10	10	10
Valor mínimo	0,25	3,64	1,51	3,14	0,30	0,61	395,70
Valor máximo	9,48	28,41	21,07	84,68	48,60	18,70	3837
Mediana	3,25	6,72	5,16	11,06	0,98	3,59	2016
Percentil 25	0,89	4,38	1,94	5,25	0,54	1,23	892,90
Percentil 75	8,19	13,66	7,86	19,66	2,13	9,71	3351
Média	3,98	10,14	6,23	18,23	5,89	5,72	2122
Desvio Padrão	3,48	8,06	5,75	24,17	15,04	6,04	1278
ICI	1,48	4,36	2,12	0,93	-4,86	1,39	1207
ICS	6,47	15,90	10,36	35,52	16,65	10,05	3036
Valor de P	0,3381	0,0282	0,0004	<0,0001	<0,0001	0,0827	0,2009

O Gráfico 3 ilustra os valores medianos e intervalos interquartílicos para MMP-1, -2, -3, -7, -8, -12 e -13 em ambos os grupos. Quando foram testadas se havia diferenças estatisticamente significativas no decorrer dos tempos analisados, a única diferença significativa encontrada foi nos níveis de MMP-1 no grupo movimento ($p < 0,05$). Quando os dois grupos foram comparados em cada intervalo de tempo, as únicas diferenças estatisticamente significativas encontradas foram nos níveis de MMP-1 no dia -7 ($p < 0,05$) e nos níveis de MMP-12 24 horas após a ativação ortodôntica ($p < 0,05$).

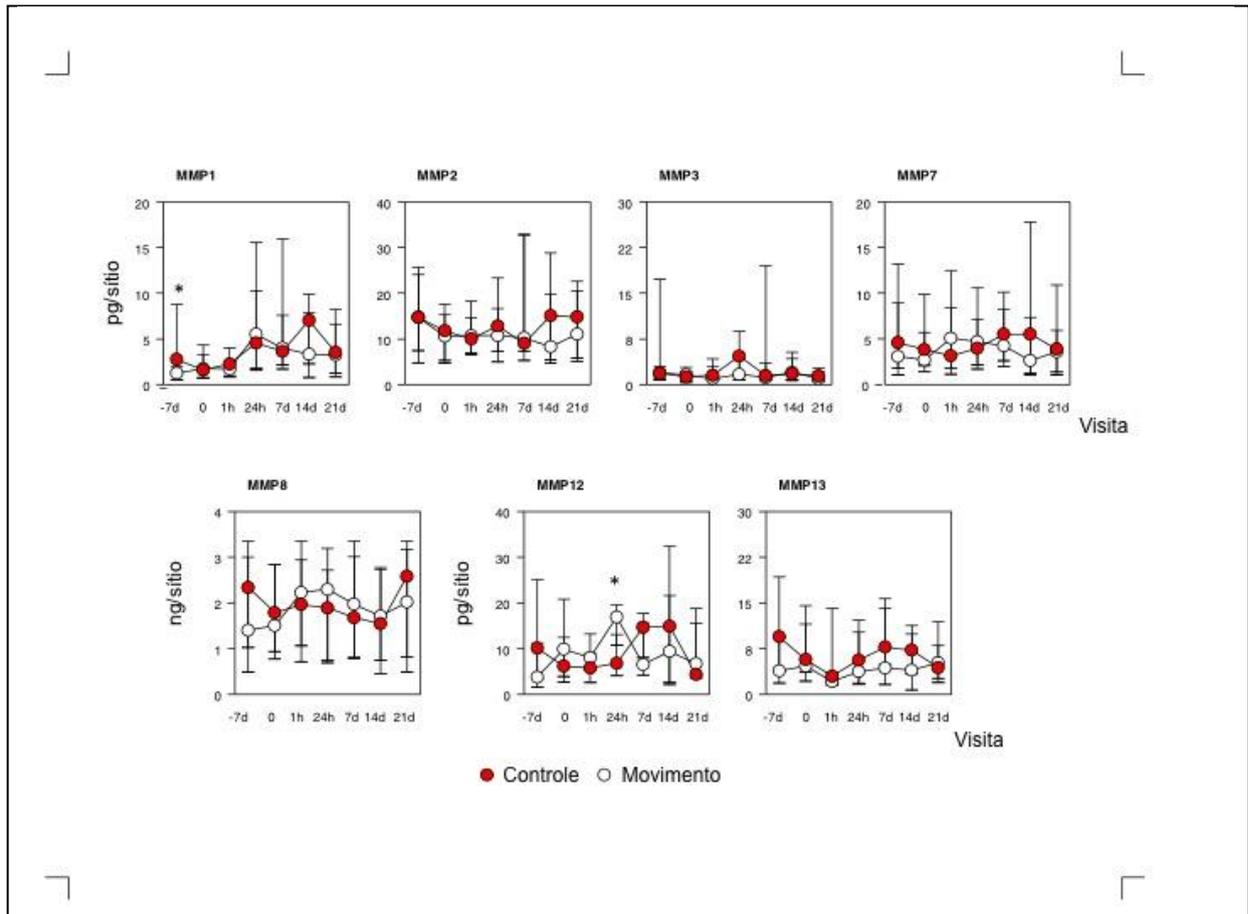


Gráfico 3 – Mediana e intervalos interquartílicos dos níveis das MMPs -1, -2, -3, -7, -8, -12 e -13 no FGC nos dois grupos nos dias -7; no dia da ativação do aparelho ortodôntico; 1 hora; 24 horas; 7 dias; 14 dias; e 21 dias após o início do movimento ortodôntico (visitas -7d, 0, 1h, 24h, 7d, 14d e 21d respectivamente)

Nota: Os círculos (vermelho para o grupo controle e branco para o grupo movimento) representam os valores medianos e os traços representam os intervalos interquartílicos de 25 e 75%. As diferenças significativas no decorrer do tempo foram testadas utilizando-se o teste de Friedman e as diferenças entre os grupos em cada intervalo de tempo foi testada utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Apenas a MMP-1 apresentou diferença estatisticamente significativa no decorrer do tempo no grupo teste ($p < 0,05$).

* $p < 0,05$ utilizando o teste de Mann-Whitney.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo não foram encontradas diferenças significativas nas alterações do volume de fluido gengival crevicular relacionado ao movimento dentário ortodôntico de pacientes com doença periodontal controlada. Estes achados estão de acordo com alguns estudos prévios que também não encontraram mudanças significativas no volume de fluido relacionado ao movimento dentário ortodôntico,^{6-9,80,174,181} mas vão de encontro com outros estudos que encontraram um aumento no volume de fluido.^{4-5,10,173,175,202-203}

Entretanto, estes estudos prévios, até mesmo aqueles que estão de acordo com os achados do presente estudo, foram baseados em acompanhamentos por períodos de tempo muito curtos como uma semana,^{5-8,181} eram estudos transversais,⁹ não coletaram sítios controle e teste no mesmo paciente²⁰² ou não tinham grupo controle^{4,173,175} e nenhum deles avaliou uma amostra com doença periodontal controlada.

Foi utilizado Gluconato de Clorexidina 0,12% em conjunto com reforço nos hábitos de higiene oral e na técnica de escovação durante todo o período do estudo (28 dias). Isto foi feito para evitar acúmulo de placa bacteriana que poderia indicar um processo inflamatório e interferir no volume do FGC e nos níveis de MMPs. O paciente ortodôntico normalmente apresenta um maior acúmulo de placa e inflamação gengival que pode ser relacionado a uma maior atividade enzimática. Desta forma, observando os resultados apresentados no Gráfico 1 (f. 55) com os índices de placa abaixo de 30% e sangramento à sondagem abaixo de 20%, pode-se constatar que os pacientes estavam bem controlados e que não houve interferência da má higiene oral nos resultados encontrados.

A coleta do fluido gengival crevicular foi feita utilizando-se a técnica com o papel absorvente por ser mais rápida, fácil e menos traumática do que as demais. Considerando-se que foram feitas várias coletas e algumas com intervalo de apenas uma hora, não poderia ser utilizado nenhuma técnica invasiva, traumática ou demorada. Além disso, técnicas que diluíssem o fluido, como a técnica da lavagem gengival, também não eram viáveis, pois impossibilitariam a comparação do volume do fluido gengival nos diferentes tempos analisados.

No presente estudo foi examinado a expressão de MMP-1, -2, -3, -7, -8, -12 e -13 em amostras de fluido gengival crevicular de dentes com periodonto reduzido, porém saudável, durante a movimentação dentária ortodôntica. Os resultados mostraram que embora os níveis de MMPs tenham flutuado durante os 21 dias de aplicação de forças ortodônticas, estas

mudanças não foram estatisticamente significativas. De fato, após a aplicação das forças ortodônticas, a única diferença estatisticamente significativa entre dentes movimentados ortodonticamente e dentes controle foi no nível de MMP-12 24 horas após a ativação ortodôntica, e a única diferença estatisticamente significativa no decorrer dos tempos analisados foi da MMP-1 no grupo movimento. Entretanto, embora a MMP-1 tenha apresentado esta diferença estatisticamente significativa no decorrer dos tempos, não foi encontrado nenhuma diferença estatística entre o grupo controle e movimento em nenhum dos intervalos analisados, sugerindo ser um achado matemático sem nenhuma plausibilidade biológica.

Estudos prévios relataram que os níveis de MMPs no FGC e a ativação das collagenases sofriam alteração com forças ortodônticas em humanos.^{6,32-33,204} Apajalahti et al.,⁶ utilizando a técnica de imunofluorimetria, encontraram níveis significativamente elevados de imunoreatividade de MMP-8 em amostras de FGC coletadas 4-8 horas após a aplicação de força quando comparado com o tempo 0 e com dentes controle. Em uma publicação posterior, o mesmo grupo estendeu estes achados utilizando a mesma metodologia e relatou aumento significativo dos níveis de MMP-8 no FGC de pacientes ortodônticos durante um mês de aplicação de força comparado com o FGC de pacientes controle.³³ Nenhum dos dois estudos encontrou imunoreatividade de MMP-1 usando a análise de Western blotting. Estes achados estão de acordo com um estudo prévio que demonstrou aumento significativo de atividade de collagenase no FGC de pacientes ortodônticos 24 horas após a ativação.³⁵

A análise de Western blotting também foi utilizada por Cantarella et al.³² para avaliar a expressão de MMP-1 e -2 em amostras de FGC nos lados tensão e pressão durante 8 horas de aplicação de força. Os níveis de MMP-1 no FGC aumentaram após uma hora de ativação do aparelho ortodôntico em ambos os lados. A metaloproteinase de matriz 2 aumentou no lado pressão chegando ao pico após 8 horas de aplicação de força, enquanto que no lado tensão ocorreu aumento de MMP-2 após uma hora, mas retornando aos níveis iniciais após 8 horas. Zimografia gelatinosa é outra técnica que já foi utilizada para detectar formas ativas e latentes de MMPs em amostras de FGC coletadas após quatro semanas de movimentação ortodôntica.¹⁸⁶ Formas parcialmente ativas de MMP-1 foram encontradas no FGC tanto no lado tensão quanto no lado pressão, mas não foram encontradas em dentes controle. MMP-9 também foi encontrada aumentada no lado pressão assim como formas ativas e pro-MMP-2 tanto no lado tensão como pressão quando comparados com dentes controle.

Existem diversas diferenças na metodologia utilizada nos estudos mencionados acima e no presente estudo que justificam as diferenças nos resultados. O presente estudo examinou pacientes com doença periodontal controlada enquanto que os outros estudos avaliaram indivíduos periodontalmente saudáveis.^{6,32-33,186} Entretanto, já foi avaliado em estudo prévio ainda não publicado,²⁰⁵ também utilizando a técnica da multianálise imunoenzimática com microesferas, os efeitos da força ortodôntica em dentes periodontalmente saudáveis. Neste estudo, não foi detectado mudanças significativas nos níveis de MMPs no FGC como resultado de forças mecânicas. Desta forma, parece ser improvável que as diferenças nos resultados seja devido ao status periodontal dos pacientes.

Outra diferença entre estudos prévios e o atual está na metodologia empregada na detecção de MMPs. Diferenças na sensibilidade dos testes poderiam explicar as discrepâncias entre os achados. No presente estudo, o limite mínimo de detecção para as MMPs analisadas oscilou de 11pg/ml para MMP-1 até 102pg/ml para MMP-7. Todas as MMPs analisadas, incluindo a MMP-1, foram detectadas pela multianálise imunoenzimática com microesferas na maioria das amostras analisadas, enquanto que estudos prévios falharam em detectar MMP-1 nas amostras de FGC.^{6,32-33} Os resultados relatados para MMP-8 usando a técnica imunofluorométrica sugeriram um limite mínimo de detecção de aproximadamente 1ng/ml.^{12,33} Na técnica da multianálise imunoenzimática com microesferas, a sensibilidade do ensaio para MMP-8 foi de 0,03ng/ml e 90% das amostras de FGC apresentaram níveis de MMP acima de 7,2ng/ml (0,36ng/sítio). Assim sendo, a sensibilidade da técnica utilizada no presente estudo parece ser adequada para detectar até mesmo pequenas diferenças nos níveis de MMPs no FGC. O método de coleta do FGC também pode ter influenciado as diferenças nos resultados entre estudos prévios e o presente estudo. Alguns autores utilizaram duas tiras de papel absorvente no sulco por três minutos para coletar as amostras de FGC.^{6,33} Isso pode ter resultado em uma coleta aproximadamente 12 vezes maior na quantidade de FGC por amostra quando comparado com a técnica de 30 segundos de coleta utilizada no presente estudo.

Em estudos anteriores, onde foram detectados aumentos nos níveis de MMP-8 no FGC como resultado da aplicação de forças ortodônticas em dentes periodontalmente saudáveis, os níveis detectados ainda assim estavam abaixo dos níveis encontrados em gengivite e periodontite.^{12,33} Isso indica que o aumento de MMP-8 no FGC foi de menor magnitude do que o aumento induzido por infecção associado a inflamação e provavelmente compatível com saúde periodontal. Entretanto, aumento de MMPs no FGC, particularmente da MMP-8, já foi associado com uma piora da condição periodontal¹⁵ e a MMP-8 já foi inclusive

apontada como um biomarcador da progressão da doença periodontal.^{20,206} Desta forma, um dos objetivos deste estudo foi testar se a aplicação da força ortodôntica em pacientes com história de periodontite não induziria a elevações nos níveis de MMPs, resultando em risco adicional a dentes previamente comprometidos. Os resultados não puderam confirmar um aumento de MMP-8 no FGC como resultado do movimento ortodôntico, sugerindo que até mesmo em pacientes susceptíveis a periodontite, a aplicação de forças ortodônticas não induz a mudanças significativas nos níveis de MMPs no FGC.

Os níveis de MMPs no FGC em pacientes com periodontite e pacientes periodontalmente saudáveis foi analisado usando a mesma técnica imunoenzimática com microesferas aplicada neste estudo. Estes achados ainda não publicados²⁰⁷ demonstraram que os níveis de MMP-2, -3 e -8 estavam mais altos em pacientes com periodontite quando comparados com os pacientes periodontalmente saudáveis, mas estes níveis diminuíram três meses após o tratamento periodontal. Os níveis de MMP no FGC encontrados nos pacientes com doença periodontal controlada avaliados no presente estudo estavam abaixo dos valores encontrados nos pacientes com periodontite mesmo após a terapia periodontal. Estes achados reforçam a afirmação de que a condição periodontal dos pacientes do presente estudo estava sob controle e que a aplicação de forças ortodônticas foi bem tolerada por dentes com periodonto reduzido, porém saudável.

Considerando a revisão de literatura feita, esta é a primeira vez que a técnica da multianálise imunoenzimática com microesferas foi utilizada para a quantificação simultânea de múltiplas MMPs no FGC de dentes periodontalmente comprometidos tratados ortodonticamente. As limitações deste estudo foram a amostra pequena, as dificuldades em padronizar a quantidade de força aplicada e a inabilidade da técnica imunoenzimática com microesferas de diferenciar a forma ativa da inativa das MMPs. Os pontos positivos do estudo foram a utilização do controle químico de placa, que minimizou o impacto da gengivite marginal no conteúdo do FGC, e o uso de dentes como controle dos mesmos pacientes utilizados como teste. Resumindo, os achados sugerem que a aplicação da força ortodôntica em dentes com periodonto reduzido, porém saudável não resultou em mudanças significativas nos níveis de MMPs no FGC. Estes resultados estão de acordo com relatos clínicos que documentaram tratamentos ortodônticos bem sucedidos em pacientes com história de doença periodontal sem efeitos negativos no periodonto.^{191,208}

6 CONCLUSÕES

Após análise do volume do fluido gengival crevicular e dos níveis de diferentes metaloproteinases de matriz em sete tempos diferentes durante a movimentação ortodôntica de elementos dentários com doença periodontal controlada, pode-se concluir que:

- a) o volume do fluido gengival crevicular não apresentou mudanças estatisticamente significativas, não podendo ser diretamente associado a estágios específicos do movimento dentário ortodôntico em dentes com doença periodontal controlada;
- b) a aplicação de força ortodôntica em dentes com periodonto reduzido, porém saudável, não resultou em mudanças significativas nos níveis de MMPs no FGC, com exceção da MMP-1 no grupo movimento no decorrer dos tempos e da MMP-12 24 horas após a ativação ortodôntica.

REFERÊNCIAS

1. Egelberg J. Permeability of the dento-gingival blood vessels. 3. Chronically inflamed gingivae. *J Periodontal Res.* 1966;1(4):287-96.
2. Griffiths GS, Sterne JA, Wilton JM, Eaton KA, Johnson NW. Associations between volume and flow rate of gingival crevicular fluid and clinical assessments of gingival inflammation in a population of British male adolescents. *J Clin Periodontol.* 1992 Aug;19(7):464-70.
3. Uitto VJ. Gingival crevice fluid--an introduction. *Periodontol 2000.* 2003;31:9-11.
4. Baldwin PD, Pender N, Last KS. Effects on tooth movement of force delivery from nickel-titanium archwires. *Eur J Orthod.* 1999 Oct;21(5):481-9.
5. Tuncer BB, Ozmeric N, Tuncer C, Teoman I, Cakilci B, Yucel A, et al. Levels of interleukin-8 during tooth movement. *Angle Orthod.* 2005 July;75(4):631-6.
6. Apajalahti S, Sorsa T, Railavo S, Ingman T. The in vivo levels of matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during initial orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2003 Dec;82(12):1018-22.
7. Yamaguchi M, Yoshii M, Kasai K. Relationship between substance P and interleukin-1beta in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement in adults. *Eur J Orthod.* 2006 June;28(3):241-6.
8. Dilsiz A, Kilic N, Aydin T, Ates FN, Zihni M, Bulut C. Leptin levels in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 2010 May;80(3):504-8.
9. Serra E, Perinetti G, D'Attilio M, Cordella C, Paolantonio M, Festa F, et al. Lactate dehydrogenase activity in gingival crevicular fluid during orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003 Aug;124(2):206-11.
10. Basaran G, Ozer T, Kaya FA, Hamamci O. Interleukins 2, 6, and 8 levels in human gingival sulcus during orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006 July;130(1):7 e1-6.

11. Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod.* 2006 June;28(3):221-40.
12. Mantyla P, Stenman M, Kinane DF, Tikanoja S, Luoto H, Salo T, et al. Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of periodontitis. *J Periodontal Res.* 2003 Aug;38(4):436-9.
13. Sorsa T, Tjaderhane L, Kontinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med.* 2006;38(5):306-21.
14. Ingman T, Sorsa T, Suomalainen K, Halinen S, Lindy O, Lauhio A, et al. Tetracycline inhibition and the cellular source of collagenase in gingival crevicular fluid in different periodontal diseases. A review article. *J Periodontol.* 1993 Feb;64(2):82-8.
15. Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A, Kent R, Socransky S, et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol.* 2010 Jan;81(1):89-98.
16. Gursoy UK, Kononen E, Pradhan-Palikhe P, Tervahartiala T, Pussinen PJ, Suominen-Taipale L, et al. Salivary MMP-8, TIMP-1, and ICTP as markers of advanced periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2010 June;37(6):487-93.
17. Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, Braun T, Sugai JV, Shelburne CA, et al. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *J Periodontol.* 2009 Mar;80(3):436-46.
18. Tuter G, Kurtis B, Serdar M, Yucel A, Ayhan E, Karaduman B, et al. Effects of phase I periodontal treatment on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J Clin Periodontol.* 2005 Sept;32(9):1011-5.
19. Reinhardt RA, Stoner JA, Golub LM, Lee HM, Nummikoski PV, Sorsa T, et al. Association of gingival crevicular fluid biomarkers during periodontal maintenance with subsequent progressive periodontitis. *J Periodontol.* 2010 Feb;81(2):251-9.
20. Hernandez M, Gamonal J, Tervahartiala T, Mantyla P, Rivera O, Dezerega A, et al. Associations between matrix metalloproteinase-8 and -14 and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid from subjects with progressive chronic periodontitis: a longitudinal study. *J Periodontol.* 2010 Nov;81(11):1644-52.

21. Alpagot T, Bell C, Lundergan W, Chambers DW, Rudin R. Longitudinal evaluation of GCF MMP-3 and TIMP-1 levels as prognostic factors for progression of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001 Apr;28(4):353-9.
22. Hernandez M, Martinez B, Tejerina JM, Valenzuela MA, Gamonal J. MMP-13 and TIMP-1 determinations in progressive chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2007 Sept;34(9):729-35.
23. Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguillon JC, et al. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol.* 2008 Mar;35(3):206-14.
24. Emingil G, Atilla G, Sorsa T, Luoto H, Kirilmaz L, Baylas H. The effect of adjunctive low-dose doxycycline therapy on clinical parameters and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2004 Jan;75(1):106-15.
25. Golub LM, Lee HM, Stoner JA, Sorsa T, Reinhardt RA, Wolff MS, et al. Subantimicrobial-dose doxycycline modulates gingival crevicular fluid biomarkers of periodontitis in postmenopausal osteopenic women. *J Periodontol.* 2008 Aug;79(8):1409-18.
26. Tuter G, Serdar M, Kurtis B, Walker SG, Atak A, Toyman U, et al. Effects of scaling and root planing and subantimicrobial dose doxycycline on gingival crevicular fluid levels of matrix metalloproteinase-8, -13 and serum levels of HsCRP in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2010 Aug;81(8):1132-9.
27. Redlich M, Reichenberg E, Harari D, Zaks B, Shoshan S, Palmon A. The effect of mechanical force on mRNA levels of collagenase, collagen type I, and tissue inhibitors of metalloproteinases in gingivae of dogs. *J Dent Res.* 2001 Dec;80(12):2080-4.
28. Takahashi I, Nishimura M, Onodera K, Bae JW, Mitani H, Okazaki M, et al. Expression of MMP-8 and MMP-13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. *J Dent Res.* 2003 Aug;82(8):646-51.
29. Lee TY, Lee KJ, Baik HS. Expression of IL-1beta, MMP-9 and TIMP-1 on the pressure side of gingiva under orthodontic loading. *Angle Orthod.* 2009 July;79(4):733-9.

30. Holliday LS, Vakani A, Archer L, Dolce C. Effects of matrix metalloproteinase inhibitors on bone resorption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2003 Sept;82(9):687-91.
31. Bildt MM, Henneman S, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. CMT-3 inhibits orthodontic tooth displacement in the rat. *Arch Oral Biol.* 2007 June;52(6):571-8.
32. Cantarella G, Cantarella R, Caltabiano M, Risuglia N, Bernardini R, Leonardi R. Levels of matrix metalloproteinases 1 and 2 in human gingival crevicular fluid during initial tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006 Nov;130(5):568 e11-6.
33. Ingman T, Apajalahti S, Mantyla P, Savolainen P, Sorsa T. 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.* 2005 Apr;27(2):202-7.
34. Capelli J, Jr, Kantarci A, Haffajee A, Teles RP, Fidel R, Jr, Figueredo CM. Matrix metalloproteinases and chemokines in the gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod.* 2011 Dec;33(6):705-11.
35. Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Halinen S, Saari H, Konttinen YT, et al. Cellular source and tetracycline-inhibition of gingival crevicular fluid collagenase of patients with labile diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 1992 Feb;19(2):146-9.
36. Heasman PA MD, Chapple IL. Periodontal Health during Orthodontic treatment. In: Heasman PA, Millett DT, Chapple IL. *The periodontium and orthodontics in health and disease.* New York: Oxford University Press; 1996. p. 195-226.
37. Beagrie G. An autoradiographic study of the gingival epithelium of mice and monkeys with thymidine H3. *Dental Practice.* 1963;14:6.
38. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 2002 Mar;23(3):144-50.
39. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1997 June;14:112-43.

40. Dewhirst FE, Stashenko PP, Mole JE, Tsurumachi T. Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1 beta. *J Immunol*. 1985 Oct;135(4):2562-8.
41. Alexander MB, Damoulis PD. The role of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease. *Curr Opin Periodontol*. 1994:39-53.
42. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(3):248-66.
43. Tewari DS, Qian Y, Tewari M, Pieringer J, Thornton RD, Taub R, et al. Mechanistic features associated with induction of metalloproteinases in human gingival fibroblasts by interleukin-1. *Arch Oral Biol*. 1994 Aug;39(8):657-64.
44. Chubinskaya S, Huch K, Mikecz K, Cs-Szabo G, Hasty KA, Kuettner KE, et al. Chondrocyte matrix metalloproteinase-8: up-regulation of neutrophil collagenase by interleukin-1 beta in human cartilage from knee and ankle joints. *Lab Invest*. 1996 Jan;74(1):232-40.
45. Havemose-Poulsen A, Holmstrup P. Factors affecting IL-1-mediated collagen metabolism by fibroblasts and the pathogenesis of periodontal disease: a review of the literature. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997;8(2):217-36.
46. Sasaki M, Kashima M, Ito T, Watanabe A, Izumiyama N, Sano M, et al. Differential regulation of metalloproteinase production, proliferation and chemotaxis of human lung fibroblasts by PDGF, interleukin-1beta and TNF-alpha. *Mediators Inflamm*. 2000;9(3-4):155-60.
47. Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ, et al. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1996 Jun;271(25):14657-60.
48. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol*. 1991 Aug;62(8):504-9.
49. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(2):197-250.

50. Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res.* 1993 Nov;28(6 Pt 2):500-10.
51. Howells GL. Cytokine networks in destructive periodontal disease. *Oral Dis.* 1995 Dec;1(4):266-70.
52. Hanemaaijer R, Koolwijk P, le Clercq L, de Vree WJ, van Hinsbergh VW. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem J.* 1993 Dec 15;296 (Pt 3):803-9.
53. Panagakos FS, Kumar S. Differentiation of human osteoblastic cells in culture: modulation of proteases by extracellular matrix and tumor necrosis factor-alpha. *Inflammation.* 1995 Aug;19(4):423-43.
54. Hanemaaijer R, Sorsa T, Konttinen YT, Ding Y, Sutinen M, Visser H, et al. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor-alpha and doxycycline. *J Biol Chem.* 1997 Dec 12;272(50):31504-9.
55. Johansson N, Westermarck J, Leppa S, Hakkinen L, Koivisto L, Lopez-Otin C, et al. Collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression by HaCaT keratinocytes is enhanced by tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta. *Cell Growth Differ.* 1997 Feb;8(2):243-50.
56. Dayer JM, Beutler B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med.* 1985 Dec;162(6):2163-8.
57. Lacraz S, Nicod L, Galve-de Rochemonteix B, Baumberger C, Dayer JM, Welgus HG. Suppression of metalloproteinase biosynthesis in human alveolar macrophages by interleukin-4. *J Clin Invest.* 1992 Aug;90(2):382-8.
58. Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RL, Ago JM. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol.* 1987 Mar 1;138(5):1464-8.
59. Lerner UH, Ohlin A. Tumor necrosis factors alpha and beta can stimulate bone resorption in cultured mouse calvariae by a prostaglandin-independent mechanism. *J Bone Miner Res.* 1993 Feb;8(2):147-55.

60. Hughes FJ, Howells GL. Interleukin-6 inhibits bone formation in vitro. *Bone Miner.* 1993 Apr;21(1):21-8.
61. Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol 2000.* 1997 June;14:144-57.
62. Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000.* 2003;31:77-104.
63. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J.* 1998 Sept;12(12):1075-95.
64. Takahashi I, Onodera K, Nishimura M, Mitnai H, Sasano Y, Mitani H. Expression of genes for gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *J Mol Histol.* 2006 Nov;37(8-9):333-42.
65. Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem.* 1996 Jan 19;271(3):1544-50.
66. Ingman T, Sorsa T, Lindy O, Koski H, Konttinen YT. Multiple forms of gelatinases/type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1994 Jan;21(1):26-31.
67. Golub LM, Sorsa T, Lee HM, Ciancio S, Sorbi D, Ramamurthy NS, et al. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol.* 1995 Feb;22(2):100-9.
68. Korostoff JM, Wang JF, Sarment DP, Stewart JC, Feldman RS, Billings PC. Analysis of in situ protease activity in chronic adult periodontitis patients: expression of activated MMP-2 and a 40 kDa serine protease. *J Periodontol.* 2000 Mar;71(3):353-60.
69. Moilanen M, Sorsa T, Stenman M, Nyberg P, Lindy O, Vesterinen J, et al. Tumor-associated trypsinogen-2 (trypsinogen-2) activates procollagenases (MMP-1, -8, -13) and stromelysin-1 (MMP-3) and degrades type I collagen. *Biochemistry.* 2003 May 13;42(18):5414-20.
70. Chandler S, Miller KM, Clements JM, Lury J, Corkill D, Anthony DC, et al. Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J Neuroimmunol.* 1997 Feb;72(2):155-61.

71. Wilson CL, Matrisian LM. Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996 Feb;28(2):123-36.
72. Crabbe T, Smith B, O'Connell J, Docherty A. Human progelatinase A can be activated by matrilysin. *FEBS Lett.* 1994 May 23;345(1):14-6.
73. Balbin M, Fueyo A, Knauper V, Pendas AM, Lopez JM, Jimenez MG, et al. Collagenase 2 (MMP-8) expression in murine tissue-remodeling processes. Analysis of its potential role in postpartum involution of the uterus. *J Biol Chem.* 1998 Sep 11;273(37):23959-68.
74. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 1998 Apr 9;392(6676):565-8.
75. Loos BG. Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol.* 2005 Nov;76(11 Suppl):2106-15.
76. Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol 2000.* 2003;31:32-42.
77. Proffit W. Biologic basis of orthodontic therapy. In: Proffit W, Fields, HW, editor. *Contemporary Orthodontics.* 3rd ed. Saint Louis: Mosby; 2000.
78. Goodson JM. Gingival crevice fluid flow. *Periodontol 2000.* 2003;31:43-54.
79. Champagne CM, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck JD, Offenbacher S. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2003;31:167-80.
80. Perinetti G, Paolantonio M, D'Attilio M, D'Archivio D, Tripodi D, Femminella B, et al. Alkaline phosphatase activity in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2002 Nov;122(5):548-56.
81. Perinetti G, Serra E, Paolantonio M, Brue C, Meo SD, Filippi MR, et al. Lactate dehydrogenase activity in human gingival crevicular fluid during orthodontic treatment: a controlled, short-term longitudinal study. *J Periodontol.* 2005 Mar;76(3):411-7.

82. Perinetti G, Paolantonio M, D'Attilio M, D'Archivio D, Dolci M, Femminella B, et al. Aspartate aminotransferase activity in gingival crevicular fluid during orthodontic treatment. A controlled short-term longitudinal study. *J Periodontol.* 2003 Feb;74(2):145-52.
83. Choi DH, Moon IS, Choi BK, Paik JW, Kim YS, Choi SH, et al. Effects of sub-antimicrobial dose doxycycline therapy on crevicular fluid MMP-8, and gingival tissue MMP-9, TIMP-1 and IL-6 levels in chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2004 Feb;39(1):20-6.
84. Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, Tschesche H, Haerian A, Kinane DF, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1996 Dec;23(12):1127-32.
85. Lee HJ, Kang IK, Chung CP, Choi SM. The subgingival microflora and gingival crevicular fluid cytokines in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1995 Nov;22(11):885-90.
86. Chen HY, Cox SW, Eley BM, Mantyla P, Ronka H, Sorsa T. Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2000 May;27(5):366-9.
87. Sorsa T, Mantyla P, Ronka H, Kallio P, Kallis GB, Lundqvist C, et al. Scientific basis of a matrix metalloproteinase-8 specific chair-side test for monitoring periodontal and peri-implant health and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Jun 30;878:130-40.
88. Figueredo CM, Areas A, Miranda LA, Fischer RG, Gustafsson A. The short-term effectiveness of non-surgical treatment in reducing protease activity in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2004 Aug;31(8):615-9.
89. Kinane DF, Darby IB, Said S, Luoto H, Sorsa T, Tikanoja S, et al. Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. *J Periodontal Res.* 2003 Aug;38(4):400-4.
90. Nomura T, Ishii A, Oishi Y, Kohma H, Hara K. Tissue inhibitors of metalloproteinases level and collagenase activity in gingival crevicular fluid: the relevance to periodontal diseases. *Oral Dis.* 1998 Dec;4(4):231-40.

91. Mancini S, Romanelli R, Laschinger CA, Overall CM, Sodek J, McCulloch CA. Assessment of a novel screening test for neutrophil collagenase activity in the diagnosis of periodontal diseases. *J Periodontol*. 1999 Nov;70(11):1292-302.
92. Lee JY, Lee YM, Shin SY, Seol YJ, Ku Y, Rhyu IC, et al. Effect of subantimicrobial dose doxycycline as an effective adjunct to scaling and root planing. *J Periodontol*. 2004 Nov;75(11):1500-8.
93. Alexander DC, Martin JC, King PJ, Powell JR, Caves J, Cohen ME. Interleukin-1 beta, prostaglandin E2, and immunoglobulin G subclasses in gingival crevicular fluid in patients undergoing periodontal therapy. *J Periodontol*. 1996 Aug;67(8):755-62.
94. Baqui AA, Meiller TF, Jabra-Rizk MA, Zhang M, Kelley JI, Falkler WA, Jr. Enhanced interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid from periodontal pockets of patients infected with human immunodeficiency virus 1. *Oral Microbiol Immunol*. 2000 Apr;15(2):67-73.
95. Cavanaugh PF, Jr., Meredith MP, Buchanan W, Doyle MJ, Reddy MS, Jeffcoat MK. Coordinate production of PGE2 and IL-1 beta in the gingival crevicular fluid of adults with periodontitis: its relationship to alveolar bone loss and disruption by twice daily treatment with ketorolac tromethamine oral rinse. *J Periodontal Res*. 1998 Feb;33(2):75-82.
96. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol*. 2000 Oct;71(10):1535-45.
97. Gemmell E, Seymour GJ. Cytokine profiles of cells extracted from humans with periodontal diseases. *J Dent Res*. 1998 Jan;77(1):16-26.
98. Hirose K, Isogai E, Miura H, Ueda I. Levels of *Porphyromonas gingivalis* Fimbriae and inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid from adult human subjects. *Microbiol Immunol*. 1997;41(1):21-6.
99. Holmlund A, Hanstrom L, Lerner UH. Bone resorbing activity and cytokine levels in gingival crevicular fluid before and after treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2004 June;31(6):475-82.
100. Hou LT, Liu CM, Chang WK. Increased interleukin-1 beta levels in gingival crevicular fluid of Chinese periodontal patients. *J Formos Med Assoc*. 1994 Feb;93(2):99-103.

101. Hou LT, Liu CM, Rossomando EF. Crevicular interleukin-1 beta in moderate and severe periodontitis patients and the effect of phase I periodontal treatment. *J Clin Periodontol.* 1995 Feb;22(2):162-7.
102. Ishihara Y, Nishihara T, Kuroyanagi T, Shirozu N, Yamagishi E, Ohguchi M, et al. Gingival crevicular interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist levels in periodontally healthy and diseased sites. *J Periodontal Res.* 1997 Aug;32(6):524-9.
103. Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1990 May;25(3):156-63.
104. Mogi M, Otogoto J, Ota N, Inagaki H, Minami M, Kojima K. Interleukin 1 beta, interleukin 6, beta 2-microglobulin, and transforming growth factor-alpha in gingival crevicular fluid from human periodontal disease. *Arch Oral Biol.* 1999 June;44(6):535-9.
105. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol.* 1995 Oct;66(10):852-9.
106. Gonzales JR, Herrmann JM, Boedeker RH, Francz PI, Biesalski H, Meyle J. Concentration of interleukin-1beta and neutrophil elastase activity in gingival crevicular fluid during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol.* 2001 June;28(6):544-9.
107. Zhang J, Kashket S, Lingstrom P. Evidence for the early onset of gingival inflammation following short-term plaque accumulation. *J Clin Periodontol.* 2002 Dec;29(12):1082-5.
108. Engebretson SP, Grbic JT, Singer R, Lamster IB. GCF IL-1beta profiles in periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2002 Jan;29(1):48-53.
109. Giannopoulou C, Cappuyns I, Mombelli A. Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol.* 2003 Nov;30(11):996-1002.
110. Al-Shammari KF, Giannobile WV, Aldredge WA, Iacono VJ, Eber RM, Wang HL, et al. Effect of non-surgical periodontal therapy on C-telopeptide pyridinoline cross-links (ICTP) and interleukin-1 levels. *J Periodontol.* 2001 Aug;72(8):1045-51.

111. Lamster IB, Pullman JR, Celenti RS, Grbic JT. The effect of tetracycline fiber therapy on beta-glucuronidase and interleukin-1 beta in crevicular fluid. *J Clin Periodontol.* 1996 Sept;23(9):816-22.
112. Engebretson SP, Lamster IB, Herrera-Abreu M, Celenti RS, Timms JM, Chaudhary AG, et al. The influence of interleukin gene polymorphism on expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in periodontal tissue and gingival crevicular fluid. *J Periodontol.* 1999 June;70(6):567-73.
113. Geivelis M, Turner DW, Pederson ED, Lamberts BL. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol.* 1993 Oct;64(10):980-3.
114. Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, Takigawa M, Myoukai F, Kurihara H, et al. Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol.* 1994 Feb;65(2):147-53.
115. Bozkurt FY, Berker E, Akkus S, Bulut S. Relationship between interleukin-6 levels in gingival crevicular fluid and periodontal status in patients with rheumatoid arthritis and adult periodontitis. *J Periodontol.* 2000 Nov;71(11):1756-60.
116. Tokoro Y, Yamamoto T, Hara K. IL-1 beta mRNA as the predominant inflammatory cytokine transcript: correlation with inflammatory cell infiltration into human gingiva. *J Oral Pathol Med.* 1996 May;25(5):225-31.
117. Mathur A, Michalowicz B, Castillo M, Aepli D. Interleukin-1 alpha, interleukin-8 and interferon-alpha levels in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res.* 1996 Oct;31(7):489-95.
118. Chung RM, Grbic JT, Lamster IB. Interleukin-8 and beta-glucuronidase in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol.* 1997 Mar;24(3):146-52.
119. Jin L, Soder B, Corbet EF. Interleukin-8 and granulocyte elastase in gingival crevicular fluid in relation to periodontopathogens in untreated adult periodontitis. *J Periodontol.* 2000 June;71(6):929-39.
120. Jin LJ, Leung WK, Corbet EF, Soder B. Relationship of changes in interleukin-8 levels and granulocyte elastase activity in gingival crevicular fluid to subgingival periodontopathogens following non-surgical periodontal therapy in subjects with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2002 July;29(7):604-14.

121. Nakashima K, Roehrich N, Cimaioni G. Osteocalcin, prostaglandin E2 and alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid: their relations to periodontal status. *J Clin Periodontol.* 1994 May;21(5):327-33.
122. Leibur E, Tuhkanen A, Pintson U, Soder PO. Prostaglandin E2 levels in blood plasma and in crevicular fluid of advanced periodontitis patients before and after surgical therapy. *Oral Dis.* 1999 July;5(3):223-8.
123. Reitan K. Biomechanical principles and reactions. In: Reitan K. *Orthodontics current principles and techniques.* St Louis: Mosby CV; 1985. p. 101-92.
124. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* 2000 Sept;289(5484):1501-4.
125. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001 Dec;142(12):5050-5.
126. Junqueira LC, J. *Tecido Ósseo: histologia básica.* 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.
127. Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol.* 1998;76(6):899-910.
128. Garant P. *Oral Cells and Tissues.* Illinois: Quintessence; 2003.
129. Horner A, Kemp P, Summers C, Bord S, Bishop NJ, Kelsall AW, et al. Expression and distribution of transforming growth factor-beta isoforms and their signaling receptors in growing human bone. *Bone.* 1998 Aug;23(2):95-102.
130. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006;8:455-98.
131. Harada S, Rodan SB, Rodan GA. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in osteoblasts. *Clin Orthop Relat Res.* 1995 Apr(313):76-80.
132. Lerner UH. Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biol.* 2000 May;19(2):107-20.

133. Robey PG, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W, et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res.* 1993 Dec;8 Suppl 2:S483-7.
134. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003 May;423(6937):337-42.
135. Kameda T, Ishikawa H, Tsutsui T. Detection and characterization of apoptosis in osteoclasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Feb;207(2):753-60.
136. Okahashi N, Koide M, Jimi E, Suda T, Nishihara T. Caspases (interleukin-1beta-converting enzyme family proteases) are involved in the regulation of the survival of osteoclasts. *Bone.* 1998 July;23(1):33-41.
137. Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Sept;250(3):776-81.
138. Bletsa A, Berggreen E, Brudvik P. Interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha expression during the early phases of orthodontic tooth movement in rats. *Eur J Oral Sci.* 2006 Oct;114(5):423-9.
139. Garlet TP, Coelho U, Silva JS, Garlet GP. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J Oral Sci.* 2007 Oct;115(5):355-62.
140. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001 Mar;119(3):307-12.
141. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Dec;15(6):457-75.
142. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology.* 1998 Mar;139(3):1329-37.

143. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000 Sept;289(5484):1504-8.
144. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res*. 2000 Jan;15(1):2-12.
145. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis*. 2002 May;8(3):147-59.
146. Ogasawara T, Yoshimine Y, Kiyoshima T, Kobayashi I, Matsuo K, Akamine A, et al. In situ expression of RANKL, RANK, osteoprotegerin and cytokines in osteoclasts of rat periodontal tissue. *J Periodontal Res*. 2004 Feb;39(1):42-9.
147. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006 Apr;129(4):469 e1-32.
148. Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL. Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dent Clin North Am*. 1988 July;32(3):411-35.
149. Takahashi N, Udagawa N, Suda T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Mar 24;256(3):449-55.
150. Teitelbaum SL, Abu-Amer Y, Ross FP. Molecular mechanisms of bone resorption. *J Cell Biochem*. 1995 Sept;59(1):1-10.
151. Nishihara T, Takahashi T, Ishihara Y, Senpuku H, Takahashi N, Suda T, et al. Membrane-associated interleukin-1 promotes osteoclast-like cell formation in vitro. *Bone Miner*. 1994 Apr;25(1):15-24.
152. Jimi E, Nakamura I, Duong LT, Ikebe T, Takahashi N, Rodan GA, et al. Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp Cell Res*. 1999 Feb 25;247(1):84-93.
153. Saito S, Ngan P, Rosol T, Saito M, Shimizu H, Shinjo N, et al. Involvement of PGE synthesis in the effect of intermittent pressure and interleukin-1 beta on bone resorption. *J Dent Res*. 1991 Jan;70(1):27-33.

154. Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, Ozawa Y, Saito K, Takiguchi H, et al. Cyclic-tension force stimulates interleukin-1 beta production by human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 1994 Sept;29(5):328-33.
155. Sabatini M, Boyce B, Aufdemorte T, Bonewald L, Mundy GR. Infusions of recombinant human interleukins 1 alpha and 1 beta cause hypercalcemia in normal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 July;85(14):5235-9.
156. Yamaguchi M. The role of inflammation in defining the type and pattern of tissue response in orthodontic tooth movement. In: Yamaguchi M. *Biological mechanisms of tooth movement.* Oxford: Wiley-Blackwell; 2009. p. 81-96.
157. Kesavalu L, Chandrasekar B, Ebersole JL. In vivo induction of proinflammatory cytokines in mouse tissue by *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol.* 2002 June;17(3):177-80.
158. Ren Y, Hazemeijer H, de Haan B, Qu N, de Vos P. Cytokine profiles in crevicular fluid during orthodontic tooth movement of short and long durations. *J Periodontol.* 2007 Mar;78(3):453-8.
159. Greenfield EM, Horowitz MC, Lavish SA. Stimulation by parathyroid hormone of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor expression in osteoblasts is an immediate-early gene response induced by cAMP signal transduction. *J Biol Chem.* 1996 May 3;271(18):10984-9.
160. Girasole G, Passeri G, Jilka RL, Manolagas SC. Interleukin-11: a new cytokine critical for osteoclast development. *J Clin Invest.* 1994 Apr;93(4):1516-24.
161. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol.* 1990 Nov 15;145(10):3297-303.
162. Owens JM, Gallagher AC, Chambers TJ. IL-10 modulates formation of osteoclasts in murine hemopoietic cultures. *J Immunol.* 1996 Jul 15;157(2):936-40.
163. Onoe Y, Miyaura C, Kaminakayashiki T, Nagai Y, Noguchi K, Chen QR, et al. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. *J Immunol.* 1996 Jan 15;156(2):758-64.

164. Miller SC, Marks SC, Jr. Local stimulation of new bone formation by prostaglandin E1: quantitative histomorphometry and comparison of delivery by minipumps and controlled-release pellets. *Bone*. 1993 Mar-Apr;14(2):143-51.
165. Baylink TM, Mohan S, Fitzsimmons RJ, Baylink DJ. Evaluation of signal transduction mechanisms for the mitogenic effects of prostaglandin E2 in normal human bone cells in vitro. *J Bone Miner Res*. 1996 Oct;11(10):1413-8.
166. Ozawa H, Imamura K, Abe E, Takahashi N, Hiraide T, Shibasaki Y, et al. Effect of a continuously applied compressive pressure on mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) in vitro. *J Cell Physiol*. 1990 Jan;142(1):177-85.
167. Yang RS, Fu WM, Wang SM, Lu KS, Liu TK, Lin-Shiau SY. Morphological changes induced by prostaglandin E in cultured rat osteoblasts. *Bone*. 1998 June;22(6):629-36.
168. Amano S, Naganuma K, Kawata Y, Kawakami K, Kitano S, Hanazawa S. Prostaglandin E2 stimulates osteoclast formation via endogenous IL-1 beta expressed through protein kinase A. *J Immunol*. 1996 Mar 1;156(5):1931-6.
169. Leiker BJ, Nanda RS, Currier GF, Howes RI, Sinha PK. The effects of exogenous prostaglandins on orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1995 Oct;108(4):380-8.
170. Nahm DS, Kim HJ, Mah J, Baek SH. 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*. 2004 Apr;26(2):129-35.
171. Grieve WG, Johnson GK, Moore RN, Reinhardt RA, DuBois LM. 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*. 1994 Apr;105(4):369-74.
172. Iwasaki LR, Haack JE, Nickel JC, Morton J. Human tooth movement in response to continuous stress of low magnitude. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2000 Feb;117(2):175-83.
173. Pender N, Samuels RH, Last KS. The monitoring of orthodontic tooth movement over a 2-year period by analysis of gingival crevicular fluid. *Eur J Orthod*. 1994 Dec;16(6):511-20.

174. Drummond S, Canavarro C, Perinetti G, Teles R, Capelli Jr J. The monitoring of gingival crevicular fluid volume during orthodontic treatment: a longitudinal randomized split-mouth study. *Eur J Orthod.* 2012 Feb;34(1):109-13.
175. Capelli Jr JFJ, R; Figueredo, CM; Teles, RP. Change in the gingival fluid volume during maxillary canine retraction. *Dental Press J Orthod.* 2010;15(2):6.
176. Ren Y, Vissink A. Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. *Eur J Oral Sci.* 2008 Apr;116(2):89-97.
177. Dudic A, Kiliaridis S, Mombelli A, Giannopoulou C. Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides. *Eur J Oral Sci.* 2006 Oct;114(5):416-22.
178. Lee KJ, Park YC, Yu HS, Choi SH, Yoo YJ. Effects of continuous and interrupted orthodontic force on interleukin-1beta and prostaglandin E2 production in gingival crevicular fluid. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004 Feb;125(2):168-77.
179. Karacay S, Saygun I, Bengi AO, Serdar M. Tumor necrosis factor-alpha levels during two different canine distalization techniques. *Angle Orthod.* 2007 Jan;77(1):142-7.
180. Ren Y, Maltha JC, Van't Hof MA, Von Den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM, Zhang D. Cytokine levels in crevicular fluid are less responsive to orthodontic force in adults than in juveniles. *J Clin Periodontol.* 2002 Aug;29(8):757-62.
181. Uematsu S, Mogi M, Deguchi T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 1996 Jan;75(1):562-7.
182. Batra P, Kharbanda O, Duggal R, Singh N, Parkash H. Alkaline phosphatase activity in gingival crevicular fluid during canine retraction. *Orthod Craniofac Res.* 2006 Feb;9(1):44-51.
183. Boyd R. Considerações durante o tratamento ortodôntico. In: Boyd R. *Ortodontia.* São Paulo: Santos; 2004. p. 442-53.
184. Brightman LJ, Terezhalmay GT, Greenwell H, Jacobs M, Enlow DH. The effects of a 0.12% chlorhexidine gluconate mouthrinse on orthodontic patients aged 11 through 17 with established gingivitis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1991 Oct;100(4):324-9.

185. Tzannetou S, Efstratiadis S, Nicolay O, Grbic J, Lamster I. Interleukin-1beta and beta-glucuronidase in gingival crevicular fluid from molars during rapid palatal expansion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1999 June;115(6):686-96.
186. Bildt MM, Bloemen M, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod*. 2009 Oct;31(5):529-35.
187. Ong MA, Wang HL, Smith FN. Interrelationship between periodontics and adult orthodontics. *J Clin Periodontol*. 1998 Apr;25(4):271-7.
188. Berglundh T, Marinello CP, Lindhe J, Thilander B, Liljenberg B. Periodontal tissue reactions to orthodontic extrusion. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 1991 May;18(5):330-6.
189. Brown IS. The effect of orthodontic therapy on certain types of periodontal defects. I. Clinical findings. *J Periodontol*. 1973 Dec;44(12):742-56.
190. Kraal JH, Digiancinto JJ, Dail RA, Lemmerman K, Peden JW. Periodontal conditions in patients after molar uprighting. *J Prosthet Dent*. 1980 Feb;43(2):156-62.
191. Re S, Corrente G, Abundo R, Cardaropoli D. Orthodontic treatment in periodontally compromised patients: 12-year report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2000 Feb;20(1):31-9.
192. Tulloch J. Adjunctive treatment for adults. In: Proffit WR, Fields HW, Sarver DM. *Contemporary orthodontics*. 2nd ed. St Louis: Mosby CV; 1993. p. 554-84.
193. Zachrisson S, Zachrisson BU. Gingival condition associated with orthodontic treatment. *Angle Orthod*. 1972 Jan;42(1):26-34.
194. Kloehn JS, Pfeifer JS. The effect of orthodontic treatment on the periodontium. *Angle Orthod*. 1974 Apr;44(2):127-34.
195. Wennstrom JPP. Mucogingival therapy - periodontal plastic surgery. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 4^a ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2003. p. 583.

196. Boyd RL, Murray P, Robertson PB. Effect of rotary electric toothbrush versus manual toothbrush on periodontal status during orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1989 Oct;96(4):342-7.
197. Lost C. Depth of alveolar bone dehiscences in relation to gingival recessions. *J Clin Periodontol*. 1984 Oct;11(9):583-9.
198. Melsen B, Allais D. Factors of importance for the development of dehiscences during labial movement of mandibular incisors: a retrospective study of adult orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2005 May;127(5):552-61; quiz 625.
199. Redlich M, Shoshan S, Palmon A. Gingival response to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1999 Aug;116(2):152-8.
200. Andreasen J. Review of root resorption systems and models. Etiology of root resorption and the homeostatic mechanisms of the periodontal ligament. . In: Davidovitch Z. *Biological mechanisms of tooth eruption and root resorption*. St Louis: Mosby CV: 1988. p. 9-22.
201. Brezniak N, Wasserstein A. Root resorption after orthodontic treatment: Part 1. Literature review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1993 Jan;103(1):62-6.
202. Last KS, Donkin C, Embery G. Glycosaminoglycans in human gingival crevicular fluid during orthodontic movement. *Arch Oral Biol*. 1988;33(12):907-12.
203. Samuels RH, Pender N, Last KS. The effects of orthodontic tooth movement on the glycosaminoglycan components of gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*. 1993 May;20(5):371-7.
204. Sorsa T, Uitto VJ, Suomalainen K. Characteristics of human salivary collagenase and its relationship to periodontal diseases. *Matrix Suppl*. 1992;1:406-7.
205. Martins CCR. Avaliação dos níveis de metaloproteinases da matriz no fluido gengival durante a movimentação dentária ortodôntica [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2010.
206. Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol*. 2009 Apr;10(4):385-93.

207. Medeiros BRCd. Perfil imunológico e microbiológico de pacientes com periodontite crônica e agressiva [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2010.

208. Folio J, Rams TE, Keyes PH. Orthodontic therapy in patients with juvenile periodontitis: clinical and microbiologic effects. *Am J Orthod.* 1985 May;87(5):421-31.

ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética



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



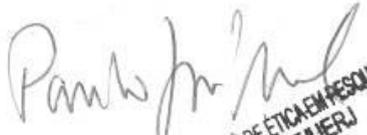
Rio de Janeiro, 14 de fevereiro de 2008

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof. Paulo José D'Albuquerque Medeiros
Para: Aut. Rhita Cristina Cunha Almeida
Orient. Prof. Jonas Capelli Junior

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (1949-CEP/HUPE) "MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS NO FLUIDO GENGIVAL DURANTE O MOVIMENTO DENTÁRIO ORTODÔNTICO EM PACIENTES COM DOENÇA PERIODONTAL CONTROLADA" 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