



**Universidade Norte do Paraná**

**UNOPAR**

---

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

LUZEVANDRO MASSON

**EXPRESSÃO DE IFN- $\gamma$  e IL-10 NO LIGAMENTO  
PERIODONTAL DURANTE O MOVIMENTO DENTÁRIO  
ORTODÔNTICO**

---

Londrina  
2013

LUZEVANDRO MASSON

**EXPRESSÃO DE IFN- $\gamma$  e IL-10 NO LIGAMENTO  
PERIODONTAL DURANTE O MOVIMENTO DENTÁRIO  
ORTODÔNTICO**

Dissertação apresentada à Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Ortodontia.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paula Vanessa Pedron Oltramari-Navarro.

Londrina  
2013

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

**Dados Internacionais de catalogação-na-publicação  
Universidade Norte do Paraná  
Biblioteca Central  
Setor de Tratamento da Informação**

M372e Masson, Luzevandro  
Expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10 no ligamento periodontal durante o movimento dentário ortodôntico / Luzevandro Masson. Londrina : [s.n], 2013.  
viii; 52p.

Dissertação (Mestrado). Odontologia. Ortodontia. Universidade Norte do Paraná.  
Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup> Paula Vanessa Pedron Oltramani-Navarro.

1- Odontologia - dissertação de mestrado - UNOPAR 2- Ortodontia 3- Citocinas 4- Reabsorção óssea 5- Inflamação 6- Movimentação dentária I- Oltramani-Navarro, Paula Vanessa, orient. II- Universidade Norte do Paraná.

CDU 616.314-089.23

LUZEVANDRO MASSON

**EXPRESSÃO DE IFN- $\gamma$  E IL-10 NO LIGAMENTO PERIODONTAL  
DURANTE O MOVIMENTO DENTÁRIO ORTODÔNTICO**

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração Ortodontia, com nota final igual a \_\_\_\_\_, conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paula Vanessa Pedron Oltramari-Navarro  
Universidade Norte do Paraná (UNOPAR)

---

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet  
Faculdade de Odontologia de Bauru-USP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thais Maria Freire Fernandes-Poleti  
Universidade Norte do Paraná (UNOPAR)

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2013.

Aos meus pais, José Arnaldo Masson e Neusa Magalhães Masson, responsáveis por minha formação pessoal e profissional, por me ensinarem o respeito às pessoas, o amor e a união da família, pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. Sem vocês, eu jamais concluiria mais esta etapa.

À minha querida esposa, Lara, por sua compreensão, carinho, paciência e o cuidado com os nossos filhos, me deu suporte para seguir neste projeto. Você é o amor da minha vida.

Aos meus tesouros Heloisa e Henrique, pelo amor que sempre me deram, mesmo estando ausente de muitos momentos de suas vidas, no cumprimento dos meus compromissos profissionais. São vocês que me dão força para seguir meu caminho.

Aos meus irmãos Luciano, Viviane e Cristiane, meus melhores amigos, que da maneira de cada um me ajudam a crescer.

À Odair e Clotilde Garcia, que através do apoio e carinho de vocês pude concluir este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida, por me dar serenidade para concluir mais este projeto.

Agradeço especialmente à **Profª Drª Paula Vanessa Pedron Oltramari-Navarro**, minha orientadora, pela maneira atenciosa que me recebeu neste curso, pela oportunidade de realização deste trabalho. Aprendi muito com sua dedicação, competência e seriedade com a ciência, a docência e a ortodontia. Obrigado pelo amparo e orientação nos momentos de dúvidas e dificuldades, você foi muito importante nesta fase da minha formação profissional.

Agradeço ao **Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet**, pelo apoio dado a pesquisa, sua presteza para comigo, e todas as sugestões para que este trabalho pudesse ter seu valor científico.

A **Profª Drª Thais Maria Freire Fernandes**, pela simplicidade e competência em ensinar, com disposição em ajudar a todos, de uma forma gentil e tranquila, compartilhando seu conhecimento.

Ao **Prof. Dr. Ricardo de Lima Navarro**, agradeço sua prestimosa colaboração na coleta da amostra para a realização deste trabalho, por estar sempre pronto a ajudar, quando solicitado. Obrigado em compartilhar o seu conhecimento e profissionalismo.

Ao **Prof. Dr. Renato Rodrigues de Almeida**, pelo carinho e pelo apoio dado para que eu pudesse iniciar esta fase da minha vida profissional. Será sempre um referencial de professor, ortodontista e ser humano.

Ao **Prof. Dr. Márcio Rodrigues de Almeida**, pelos ensinamentos transmitidos, pelo estímulo a busca de conhecimento com qualidade, pelo incentivo e apoio constantes nesta jornada de trabalho, pelo despertar do senso crítico e pela amizade.

A **Profª Drª Ana Cláudia de Castro Ferreira Conti**, pela dedicação e empenho em nos oferecer um aprendizado alicerçado em evidências científicas, e acima de tudo, pela forma gentil e educada com que sempre nos tratou.

A **Profª Drª Karen Barros Parron Fernandes e Profª Drª Regina Célia Poli-Frederico**, que de um modo ou de outro, contribuíram para a elaboração deste trabalho, as quais, sempre que procuradas não mediram esforços em ajudar, agradeço pela atenção dispensada.

À **Universidade Norte do Paraná**, UNOPAR, representada pelo Reitor, **Prof. Cleber Fagundes Ramos**.

À Pró-Reitoria de Pesquisa, e Pós Graduação representada pelo **Prof. Dr. Hélio Hiroshi Suguimoto**.

À Coordenação do Curso de Mestrado em Odontologia, representada pelo **Prof. Dr. Alcides Gonini Junior**.

A **todos os funcionários da secretaria e da clínica** de Odontologia da UNOPAR.

Aos **funcionários da biblioteca da UNOPAR**, em especial a **Justymara Fernanda dos Santos Serrano**, agradeço sua gentileza, disponibilidade e conhecimento transmitido.

Aos meus amigos de turma, **Caio, Joseli, Laís, Natália, Ricardo**, que tanto contribuíram para que eu pudesse concretizar meus sonhos, a todos vocês os meus agradecimentos pelos momentos que participaram dos meus sorrisos, dividiram minhas angústias e ansiedades, vocês plantaram sementes na minha história. Porque nesta vida tenho a certeza de que todos os que se encontram deixam um pouco de si e levam um pouco de nós.

Aos meus amigos **José Walmer de Oliveira e Edmilson Nobumitu Kaneshima**, agradeço por compartilharem conhecimentos e experiências clínicas, sempre me estimulando a busca de evidências científicas.

MASSON, Luzevandro. **Expressão de IFN- $\gamma$  e IL-10 no ligamento periodontal durante o movimento dentário ortodôntico**. 2013. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ortodontia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2013.

## RESUMO

O objetivo deste estudo clínico foi investigar o papel do interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e da interleucina-10 (IL-10) na movimentação ortodôntica. Para tanto, o ligamento periodontal de 84 pré-molares com indicação ortodôntica para exodontia foi utilizado e dividido em 5 grupos: G1 (n=20, controle), dentes não submetidos a forças; G2 (n=13), dentes submetidos a forças ortodônticas durante 3 dias; G3 (n=14), dentes submetidos a forças ortodônticas durante 7 dias; G4 (n=23), dentes submetidos a forças ortodônticas durante 15 dias; e G5 (n=14), dentes submetidos a forças ortodônticas durante 21 dias. A coleta do ligamento periodontal (LP) foi realizada imediatamente após a extração. A análise da expressão de RNAm para tais fatores no ligamento periodontal, nos lados de pressão e tensão (terço apical, médio e cervical) foi realizada por meio de RT-PCR (*reação em cadeia da polimerase em tempo real*). Com relação à expressão das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10, foram observados níveis estatisticamente mais altos nos grupos G2, G3 e G4 em comparação aos grupos G1 e G5 ( $p=0,0001$ ), nas diferentes regiões da raiz dentária. Além disso, os níveis dessas citocinas no G2 foram estatisticamente similares aos do G3 e G4. Contudo, o grupo G3 apresentou níveis estatisticamente maiores que o G4. Apesar das diferenças observadas entre os grupos para as variáveis IMC e apinhamento, não foi observada associação entre essas variáveis e os níveis IFN- $\gamma$  ou IL-10 (Correlação de Spearman,  $p>0,05$ ). Os dados encontrados no presente estudo evidenciam a presença de IFN- $\gamma$  e IL-10 no período inicial e de hialinização da movimentação ortodôntica, com níveis de expressão semelhantes nas áreas de pressão e tensão.

**Palavras-chave:** Ortodontia. Citocinas. Reabsorção Óssea. Inflamação e Movimentação Dentária.



MASSON, Luzevandro. **IFN- $\gamma$  and IL-10 expression in the periodontal ligament during orthodontic tooth movement.** 2013. 52 p. Dissertation (Master's in Orthodontics) – Center of Biological Sciences and Health, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2013.

### **ABSTRACT**

The purpose of this clinical study was to investigate the role of interferon- gamma (IFN- $\gamma$ ) and of interleukin-10 (IL-10) in orthodontic movement. Thus, the periodontal ligament (PL) of 84 premolars with an orthodontic indication for exodontias was used, and divided into 5 groups: G1 (n=20, control group), teeth not submitted to orthodontic forces; G2 (n=13), teeth submitted to orthodontic forces for 3 days; G3 (n=14) teeth submitted to orthodontic forces for 7 days; G4 (n=23), teeth submitted to orthodontic forces for 15 days; and G5 (n=14), teeth submitted to orthodontic forces for 21 days. The collection of the PL was made immediately after extraction. Furthermore, the Body Mass Index (BMI) and the severity of crowding among the groups were assessed. Regarding the expression of the IFN- $\gamma$  and IL-10 cytokines, statistically greater levels were observed in groups G2, G3, and G4 as compared to groups G1 and G5 (Kruskal-Wallis,  $p=0.0001$ ), in all dental root regions. In addition, the levels of these cytokines in G2 were statistically similar to those of G3 and G4. Group G3, however, had statistically higher values than G4. Despite the differences observed among the groups for BMI and crowding variables, no associations were found between these variables and IFN- $\gamma$  or IL-10 levels (Spearman's Correlation,  $p>0.05$ ). The data found in the present study show the presence of IFN- $\gamma$  and IL-10 in the initial period and in the hyalinization of orthodontic movement, with similar levels of expression in areas of pressure and tension.

**Key words:** Orthodontics. Cytokines. Bone Resorption. Inflammation and Tooth Movement

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IL-10 .....	Interleucina-10
IFN- $\gamma$ .....	Interferon-gama
LP.....	Ligamento periodontal
RNA <sub>m</sub> .....	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR.....	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
IFN.....	Interferon
IL.....	Interleucina
CSF.....	Fator estimulador de colônia
TNF.....	Fator de necrose tumoral
TGF.....	Fator de transformação de crescimento
RANK.....	Ativador do receptor de fator Kappa B
RANKL.....	Ativador do receptor de fator Kappa B ligante
OPG.....	Osteoprotegerina
M-CSF.....	Fator estimulante de colônias de macrófagos
PCR.....	Reação em cadeia polimerase
RNA.....	Ácido ribonucleico
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
CEP.....	Comitê de ética em pesquisa
UNOPAR.....	Universidade Norte do Paraná
Ct.....	Ciclo limiar
SOCS.....	Supressores de sinalização de citocinas

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
<b>3 ARTIGO .....</b>	<b>20</b>
3.1 EXPRESSÃO DE IFN- $\gamma$ E IL-10 NO LIGAMENTO PERIODONTAL DURANTE O MOVIMENTO DENTÁRIO ORTODÔNTICO .....	20
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>49</b>
Apêndice 1 - Instrumento de Doação de Dentes.....	50
<b>ANEXOS.....</b>	<b>51</b>
Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa .....	52

## 1 INTRODUÇÃO

A movimentação dentária é um procedimento ortodôntico utilizado para corrigir distúrbios oclusais e estéticos<sup>1</sup>. Durante a movimentação ortodôntica, ocorrem mudanças macro e microscópicas nos dentes e nos tecidos paradentários, como ligamento periodontal e osso alveolar, desencadeadas por forças mecânicas suaves e contínuas aplicadas diretamente sobre os dentes<sup>2,3</sup>.

A remodelação óssea é um processo natural do organismo e deve ser mantida pelo equilíbrio entre reabsorção óssea pelos osteoclastos e aposição óssea pelos osteoblastos<sup>4,5</sup>. O estímulo mecânico criado durante a movimentação dentária induzida altera esse equilíbrio, gerando padrões complexos de forças<sup>6</sup>, que resultam em duas áreas distintas: uma na qual predominam as forças de pressão, com maior atividade de osteoclastos e conseqüentemente maior reabsorção óssea; e outra onde predominam forças de tensão, aumento da atividade osteoblástica e maior aposição óssea<sup>4,6</sup>. Contudo, sabe-se atualmente que estas áreas de pressão e tensão podem ser encontradas dispostas conjuntamente em uma única face dentária<sup>7</sup>. Assim, torna-se fundamental avaliar as áreas de pressão e tensão de uma forma completa, considerando todas as faces (vestibular, palatina/lingual, mesial e distal), além de todos os níveis radiculares (apical, médio e cervical).

A resposta tecidual desencadeada pelas forças ortodônticas tem sido descrita por alguns pesquisadores como uma inflamação asséptica<sup>3,4,8</sup>, enquanto outros<sup>4,9</sup> contestam tal classificação, alegando que não se trata de um processo patológico por não apresentar todos os sinais clássicos da inflamação. Independente de constituir ou não uma inflamação, este processo tem mostrado que o estímulo mecânico desencadeia a liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas que estão envolvidas no recrutamento, diferenciação e ativação de osteoclastos<sup>3,5,10,11</sup>.

Recentemente demonstrou-se na movimentação dentária em humanos uma maior expressão de citocinas pró-inflamatórias na área sob força de pressão, correlacionada a maior reabsorção óssea e atividade osteoclástica<sup>12</sup>. Enquanto que as citocinas caracteristicamente anti-inflamatórias parecem apresentar um papel protetor, inibindo a reabsorção óssea alveolar.

Desta forma, o objetivo desta pesquisa é compreender melhor os mecanismos envolvidos no processo de remodelação óssea após a aplicação de

forças ortodônticas sobre os dentes, por meio da quantificação da expressão de RNAm para os fatores IFN- $\gamma$  e Il-10 em diferentes áreas radiculares de dentes previamente indicados para extração, através de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A movimentação dentária é um procedimento ortodôntico utilizado para corrigir distúrbios oclusais e estéticos<sup>1</sup>. Durante a movimentação ortodôntica, ocorrem mudanças macro e microscópicas nos dentes e nos tecidos paradentários, como ligamento periodontal e osso alveolar, desencadeadas por forças mecânicas suaves e contínuas aplicadas diretamente sobre os dentes<sup>2-4</sup>.

O tecido ósseo é um tecido extremamente ativo e importante na regulação de várias funções, como o armazenamento de cálcio<sup>13</sup>, a sustentação e proteção dos órgãos<sup>14</sup>. A rigidez e resistência estruturais são oferecidas pelo tecido ósseo não apenas pela quantidade de material mineral, mas pelo arranjo geométrico observado neste tecido<sup>15</sup>. Essa estrutura sofre desgastes com o tempo e precisa ser reparada para não comprometer as funções do esqueleto<sup>14,16</sup>.

Na composição do tecido ósseo, cerca de 90% do total de proteína óssea é de colágeno tipo I. O componente orgânico remanescente consiste em proteínas não-estruturais como fatores de crescimento, proteínas sanguíneas, osteonectina e osteocalcina. A fase inorgânica do tecido ósseo é composta principalmente de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )<sup>14,17</sup>. Estes componentes devem estar em equilíbrio para que o tecido ósseo possa resistir à ruptura pelo peso do esqueleto e seja dúctil para absorver a energia da carga de impacto<sup>15</sup>. O osso maduro é composto de dois tipos diferentes de tecidos, o osso cortical e o osso esponjoso.

O osso cortical constitui a camada de osso mais externa e rígida, responsável pela estabilidade do esqueleto. Este tecido apresenta aparência lisa, branca e sólida. O osso cortical contém ósteons (sistemas de Havers), que são compostos por um canal central (canal de Havers) rodeado por lamelas de matriz óssea. Dentro das lamelas existem osteócitos incorporados em lacunas. O canal de Havers engloba os vasos sanguíneos e células nervosas ao longo do osso e se comunica com osteócitos em lacunas através de canalículos<sup>14,17</sup>. Além disso, a cortical externa apresenta uma membrana, o perióstio, constituído por uma camada externa fibrosa e uma interna com potencial osteogênico que permite a proliferação do tecido ósseo<sup>17</sup>.

Já o interior do tecido ósseo é formado por uma rede trabeculada (esponjosa) a qual abriga a medula óssea (tecido conjuntivo embrionário). Esse osso

esponjoso assegura a elasticidade e a estabilidade do esqueleto<sup>18</sup>.

O tecido ósseo é composto por células como os osteoclastos que anualmente reabsorvem 10% de todo esqueleto, em seu lugar é sintetizado osso novo que tem como responsáveis outras células ósseas, os osteoblastos<sup>19</sup>. Esse processo relaciona o sistema esquelético ao sistema imune, por meio do compartilhamento de hormônios sistêmicos, citocinas produzidas localmente e fatores de crescimento<sup>20</sup>. Além disso, o tecido ósseo responde a estímulos mecânicos: a falta de estímulo mecânico pode levar à reabsorção óssea, como se observa em astronautas em longos períodos na ausência de gravidade ou em pacientes imobilizados<sup>21</sup>, ou na reabsorção do osso alveolar em edêntulos<sup>22</sup>.

A remodelação óssea é um processo natural do organismo e deve ser mantida pelo equilíbrio entre reabsorção óssea pelos osteoclastos e aposição óssea pelos osteoblastos<sup>4,5</sup>. O estímulo mecânico criado durante a movimentação ortodôntica altera esse equilíbrio, gerando complexos padrões de forças<sup>6</sup>, que resultam em duas áreas distintas: uma na qual predominam as forças de pressão, com maior atividade de osteoclastos e conseqüentemente maior reabsorção óssea; e outra onde predominam forças de tensão, aumento da atividade osteoblástica e maior aposição óssea<sup>3,4</sup>. Contudo, sabe-se atualmente que estas áreas de pressão e tensão podem ser encontradas dispostas conjuntamente em uma única face dentária. Assim, torna-se fundamental avaliar as áreas de pressão e tensão de uma forma completa, considerando todas as faces (vestibular, palatina/lingual, mesial e distal), além de todos os níveis radiculares (apical, médio e cervical)<sup>6,7</sup>.

A maioria dos tratamentos ortodônticos com aparelhos fixos inicia com a fase de alinhamento e nivelamento, a qual utiliza arcos de fios superelásticos como o Nitinol redondo, que libera forças suaves criando um estímulo mecânico no dente e nos tecidos vizinhos. Estes arcos de nivelamento com grande elasticidade são aplicados para corrigir as discrepâncias no posicionamento horizontal, vertical e rotacional<sup>23,24</sup>. O conceito de força suave é usado livremente e de forma arbitrária, pois não há consenso científico à cerca dos valores numéricos da magnitude de força vigente. Esta força deveria ser capaz de produzir uma quantidade máxima de movimento dentário sem destruição tecidual e com o máximo conforto para o paciente<sup>3,25</sup>. Observa-se na literatura estudos relatando forças suaves entre 17,65 cN a 98,06 cN<sup>23,24,26-32</sup>.

Nesse sentido, desde o início do século XX busca-se compreender o

mecanismo biológico da remodelação óssea proveniente de estímulos mecânicos produzidos pelas forças ortodônticas. A partir de então, diferentes teorias foram criadas para explicar como o estímulo mecânico gerado por forças ortodônticas são traduzidas em alterações biológicas que modificam o metabolismo ósseo, atribuindo importância a alterações no fluxo sanguíneo e fenômenos elétricos<sup>3,4,10</sup>. A teoria de pressão-tensão afirma que a aplicação de uma força ótima sobre o dente estimula as células embrionárias mesenquimais do ligamento periodontal no lado de pressão a se diferenciarem em osteoclastos e no lado de tensão em osteoblastos, causando reabsorção e aposição óssea respectivamente<sup>10</sup>. A teoria da flexão óssea afirma que ao ativar o aparelho ortodôntico a força liberada no dente é transmitida a todos os tecidos próximos, produzindo uma inclinação do osso, dente e estruturas sólidas do ligamento periodontal. A força liberada ao dente é dissipada ao longo do osso pelo desenvolvimento de linhas de tensão que produzem estímulos, alterando as respostas biológicas das células que se encontram perpendiculares às linhas de tensão. A atividade alterada das células modifica a forma e a organização interna do osso para acomodar a força exógena que está atuando sobre ele<sup>3,4</sup>. Outra teoria é sobre sinais bioelétricos, a qual afirma que a força mecânica aplicada gera um potencial elétrico no tecido tensionado, carregando macromoléculas que interagem com sítios específicos na membrana celular ou mobiliza íons que atravessam a membrana celular. No tecido ósseo estimulado, a superfície côncava é eletronegativa e favorece a atividade osteoblástica, enquanto a superfície convexa apresenta área de positividade ou neutralidade elétrica estimulando a atividade osteoclástica<sup>3,4</sup>.

A resposta tecidual desencadeada pelas forças ortodônticas tem sido descrita por alguns pesquisadores como uma inflamação asséptica<sup>4,8,33-35</sup>, enquanto outros<sup>4,9</sup> contestam tal classificação, alegando que não se trata de um processo patológico por não apresentar todos os sinais clássicos da inflamação. Clinicamente, este mecanismo da aplicação da força ortodôntica e a resposta tecidual, chamado movimentação dentária, é formado por 4 fases, sendo a primeira fase um movimento inicial do dente dentro do alvéolo ósseo nas últimas 24 horas a 2 dias diminuindo a largura do ligamento periodontal no lado de pressão. Imediatamente após a fase inicial, há um período lento com taxas relativamente baixas de deslocamento dentário ou nenhum deslocamento por 4 a 30 dias. Tem sido sugerido que este período lento é produzido pela hialinização do ligamento



periodontal em áreas de pressão. Nenhum movimento dentário ocorre até que as células removam todo o tecido necrosado. A terceira fase da movimentação dentária apresenta uma taxa de movimento gradualmente ou subitamente aumentado, e este movimento segue contínuo na quarta fase. A terceira e a quarta fase compreendem a maior parte da movimentação dentária do tratamento ortodôntico<sup>3,36-40</sup>.

Independente de constituir ou não uma inflamação, este processo tem mostrado que o estímulo mecânico desencadeia a liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas que estão envolvidas no recrutamento, diferenciação e ativação de osteoclastos<sup>3,5,10,11</sup>.

O termo citocina é utilizado para um extenso grupo de proteínas de baixo peso molecular, algumas contendo moléculas de açúcar ligadas (glicoproteínas), que atuam como sinalizadores entre as células do sistema imune e na modulação da resposta inflamatória. Constituem um grupo de fatores extracelulares que podem ser produzidos por diversas células, como monócitos, macrófagos, linfócitos e outras que não sejam linfóides. As citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias: interferon (IFN), interleucina (IL), fator estimulador de colônia (CSF), fator de necrose tumoral (TNF) e fator de transformação de crescimento (TGF). Quanto a sua ação, podem ser divididas em citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, com as seguintes funções: regular a duração e a intensidade das respostas específicas; recrutar células efetoras para as áreas onde se desenvolvem respostas e induzir a geração e a maturação de novas células a partir de precursores<sup>4,41-43</sup>.

As citocinas respondem aos sinais locais e são produzidas durante a fase de ativação e fase efetora da imunidade para mediar e regular a resposta inflamatória e imunológica, apresentando vida média curta. Elas apenas estimulam as células com receptores específicos na membrana da célula alvo, e demonstram ação extremamente potente. São moléculas pleiotrópicas (podem atuar sobre muitos tipos celulares diferentes), produzindo numerosos efeitos sobre as células do sistema imune e modulando a resposta inflamatória. Ainda, são redundantes, pois várias citocinas podem efetuar as mesmas ações. As citocinas podem induzir efeitos diferentes sobre as mesmas células alvo, de forma separada ou simultânea. Podem também influenciar na ação de outras citocinas de forma antagônica ou sinérgica<sup>4,41-43</sup>.

A ativação de células por estímulos mecânicos para produzir

citocinas não está bem estabelecida, acredita-se que ocorra o envolvimento de osteócitos nesse processo através do fluxo oscilatório de fluidos e por fatores moduladores solúveis<sup>34,44-46</sup>. Entretanto, a maior parte do conhecimento disponível a respeito da osteoimunologia provem de pesquisas à cerca de diferentes patologias<sup>20,47</sup>, como neoplasias<sup>48</sup>, doenças periodontais<sup>49,50</sup> e artrite<sup>49,51</sup>. Além disso, há que se considerar a movimentação ortodôntica como um processo único, no qual áreas de formação e reabsorção óssea podem ser encontrados muito próximas. Dessa forma, os dados provenientes de modelos de diferentes patologias ou mesmo de experimentos *in vitro*, muitas vezes extrapolados para a formulação de hipóteses para o estudo da biologia da movimentação dentária não são de forma alguma definitivos, e necessitam de confirmação experimental em modelos apropriados.

A descoberta de fatores envolvidos na osteoclastogênese, como o ativador do receptor do fator nuclear Kappa B (RANK) e o ativador do receptor do fator nuclear Kappa B ligante (RANKL), além da osteoprotegerina (OPG), demonstra a importância de sinais químicos para a diferenciação de osteoclastos<sup>47,52-54</sup>. A ativação de osteoclastos é controlada principalmente por duas diferentes citocinas, o fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) e pela ativação do receptor RANK, um receptor da família dos TNF, pela interação com seu ligante RANKL<sup>14,17,47</sup>. O RANK é expresso tanto por osteoclastos maduros como pelos seus precursores, enquanto RANKL é expresso por osteoblastos, linfócitos T, células estromais da medula óssea e outros tipos celulares<sup>14,17,47</sup>. Ainda que o RANKL tenha sido identificado como o principal fator na osteoclastogênese, várias citocinas (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) envolvidas em processos inflamatórios apresentam um papel fundamental no processo de reabsorção óssea, uma vez que a expressão de RANKL é modulada por tais mediadores<sup>5,14,20,52,55</sup>. O terceiro mediador envolvido diretamente na osteoclastogênese é a osteoprotegerina (OPG), um receptor solúvel secretado por osteoblastos capaz de ligar-se ao RANKL, impedindo assim sua ligação ao RANK e consequente ativação da célula<sup>14,20</sup>.

Um fator que influencia a relação RANK/RANKL/OPG é a quantidade de tecido adiposo que o indivíduo possui, pois este tecido produz os hormônios leptina e adiponectina. A leptina influencia o metabolismo ósseo causando uma diminuição da homeostasia óssea. A ação é de inibir a formação e a reabsorção óssea por meio da redução da expressão de RANK e RANKL e um aumento da expressão da osteoprotegerina, implicando um movimento dentário

lento provocado por uma taxa de homeostasia óssea baixa e uma densidade mineral óssea alta<sup>56,57</sup>. Quanto à adiponectina, existe uma modulação da produção de osteoblastos pela interação de RANKL e osteoprotegerina, diminuindo a osteoclastogênese, reduzindo a movimentação dentária<sup>58</sup>. Assim, atenção deve ser dada aos pacientes obesos, nos quais o nível sanguíneo de leptina encontrado é geralmente alto, enquanto o da adiponectina é mais baixo em comparação aos indivíduos de peso normal<sup>59</sup>, o que torna a movimentação dentária mais lenta.

A IL-1 é uma citocina de caráter pró-inflamatório que tem uma larga variedade de atividades biológicas em diferentes tecidos e tipos celulares. Sabe-se, atualmente, que ela está relacionada à destruição patológica de tecido ósseo em diferentes doenças, como artrite, doenças periodontais e lesões periapicais<sup>60, 61,62,63</sup>. Juntamente com outras citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , a IL-1 cria um desequilíbrio no metabolismo ósseo que favorece a reabsorção óssea e contribui para a diferenciação e ativação de osteoclastos através da indução da expressão de RANKL em osteoblastos<sup>5,61,63</sup>. Recentemente, demonstrou-se na movimentação ortodôntica em humanos uma maior expressão de citocinas pró-inflamatórias na área sob força de pressão, correlacionada com maior reabsorção óssea e atividade de osteoclastos<sup>12</sup>.

Uma citocina de ação pouco compreendida na remodelação óssea é o IFN- $\gamma$ , o qual pertence à família das citocinas Interferon tipo II<sup>11,64</sup>. Este mediador apresenta importante papel na regulação do processo inflamatório associado ao aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias e infiltrados de leucócitos. Entretanto, evidências recentes tem mostrado uma dupla função para o IFN- $\gamma$  na inflamação, sendo capaz de atuar tanto com função pró-inflamatória através da ativação de citocinas como IL-12, IL-15, TNF- $\alpha$ , e função anti-inflamatória inibindo a ação da IL-1 e IL-8 e induzindo a apoptose em leucócitos<sup>11,65</sup>.

O IFN- $\gamma$  parece ser a citocina predominante produzida pelas células T em lesões periodontais, e um aumento na produção está relacionado à progressão da doença periodontal<sup>66,67</sup>, e parece contribuir para a reabsorção óssea em modelos experimentais de maneira indireta<sup>68</sup>. Entretanto, estudos *in vitro* sugerem que esta citocina possui a capacidade de inibir a formação e a expressão gênica de osteoclastos, atuando diretamente sobre essas células<sup>69</sup>. Dessa forma, o IFN- $\gamma$  pode estimular linfócitos T a produzirem fatores osteoclastogênicos como TNF- $\alpha$  e RANKL, de forma que estimularia indiretamente a osteoclastogênese<sup>70</sup>. Um estudo

recente empregou um modelo de movimentação dentária induzida em ratos e observou que injeções de INF- $\gamma$  reduziram a reabsorção óssea, sugerindo sua utilização clínica para inibição da movimentação em sítios de ancoragem<sup>71</sup>.

Em contraste com a promoção da reabsorção óssea por meio de citocinas do padrão Th1, citocinas Th2, como IL-10 e IL-4, caracteristicamente anti-inflamatórias, parecem apresentar um papel protetor, diminuindo a destruição óssea<sup>67,72,73</sup>. A expressão de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, inibe a reabsorção óssea alveolar, a qual ainda constitui um mecanismo desconhecido, mas que parece levar a uma regulação negativa da expressão de RANKL e M-CSF, além de um aumento na expressão de OPG<sup>12,74,75</sup>. Além da modulação dos sinalizadores disponíveis no microambiente, foi demonstrado *in vitro* que a IL-10 apresenta a capacidade de inibir a expressão de fatores de transcrição necessários à ativação dos osteoclastos, quando adicionada ao meio de cultura destas células, através de receptores para IL-10 expressos constitutivamente por estas células<sup>76</sup>. O mecanismo pelo qual esta citocina atua ainda não está bem definido, mas existem evidências de que está relacionado à expressão de proteínas da família dos Supressores de Sinalização de Citocinas (SOCS), principalmente SOCS-1 e SOCS-3<sup>66,77,78</sup>. Concordando com estes resultados, verificou-se que na movimentação ortodôntica ocorre uma maior expressão de IL-10 no lado de tensão, onde a atividade de osteoclastos é proporcionalmente menor, e uma menor expressão desta citocina no lado de pressão, onde ocorre maior reabsorção óssea<sup>12</sup>. Evidências recentes sugerem que a ação da IL-10 na modulação da movimentação dentária acontece parcialmente, via indução de supressores de sinalização de citocinas (SOCS-1 e -3, mas não de SOCS-2).

O método utilizado para quantificar estas citocinas é o RT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real), que pode ser considerado um dos métodos mais sensíveis, eficientes, rápidos e reprodutíveis para medir a expressão de genes. RT-PCR é a técnica de coleta de dados durante o processo de PCR, a qual combina a amplificação e detecção da expressão de um gene numa única etapa. Isto é conseguido usando uma variedade de produtos químicos fluorescentes diferentes que correlacionam a concentração do produto de PCR para a intensidade de fluorescência. As reações são caracterizadas por um ciclo de PCR em que a amplificação do alvo (RNA ou DNA) é detectado pela primeira vez, através de uma intensidade de fluorescência maior. Este valor é referido como limite de ciclo (Ct).

Normalmente, são utilizados genes com expressão estável para controle de ensaios de expressão gênica, e um dos genes que possui esta função é a  $\beta$ -actina<sup>79</sup>.

Desta forma, o objetivo desta pesquisa é compreender melhor os mecanismos envolvidos no processo de remodelação óssea após a aplicação de forças ortodônticas sobre os dentes, por meio da quantificação da expressão de RNAm para os fatores IFN- $\gamma$  e IL-10 em diferentes áreas radiculares de dentes previamente indicados para extração, através de RT-PCR.

### 3 ARTIGO

#### 3.1 EXPRESSÃO DE IFN- $\gamma$ E IL-10 NO LIGAMENTO PERIODONTAL DURANTE O MOVIMENTO DENTÁRIO ORTODÔNTICO

##### RESUMO

O objetivo deste estudo clínico foi investigar o papel do interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e da interleucina-10 (IL-10) na movimentação ortodôntica. Para tanto, o ligamento periodontal de 84 pré-molares com indicação ortodôntica para exodontia foi utilizado e dividido em 5 grupos: G1 (n=20, controle), dentes não submetidos a forças; G2 (n=13), dentes submetidos a forças ortodônticas durante 3 dias; G3 (n=14), dentes submetidos a forças ortodônticas durante 7 dias; G4 (n=23), dentes submetidos a forças ortodônticas durante 15 dias; e G5 (n=14), dentes submetidos a forças ortodônticas durante 21 dias. A coleta do ligamento periodontal (LP) foi realizada imediatamente após a extração. A análise da expressão de RNAmensageiro (RNAm) para tais fatores no ligamento periodontal, nos lados de pressão e tensão (terço apical, médio e cervical) foi realizada por meio de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real). O tratamento estatístico avaliou a expressão das citocinas IFN- $\gamma$  (Tabela 1) e IL-10 (Tabela 2), as quais apresentaram níveis estatisticamente mais altos nos grupos G2, G3 e G4 em comparação aos grupos G1 e G5 ( $p=0,0001$ ), nas diferentes regiões da raiz dentária. Além disso, os níveis dessas citocinas no G2 foram estatisticamente similares aos do G3 e G4. Contudo, o grupo G3 apresentou níveis estatisticamente maiores que o G4. Pode-se concluir que a IL-10 e o IFN- $\gamma$  estão presentes na fase inicial e de hialinização da movimentação ortodôntica, com níveis de expressão semelhantes em áreas com grande estímulo de pressão e tensão, como também em áreas intermediárias.

**Palavras-chave:** Ortodontia. Citocinas. Reabsorção Óssea. Inflamação e Movimentação Dentária.

##### INTRODUÇÃO

A movimentação dentária é um procedimento ortodôntico utilizado para corrigir distúrbios oclusais e estéticos<sup>1</sup>. Durante a movimentação ortodôntica, ocorrem mudanças macro e microscópicas nos dentes e nos tecidos paradentários, como ligamento periodontal e osso alveolar, desencadeadas por forças mecânicas suaves e contínuas aplicadas diretamente sobre os dentes<sup>2-4</sup>.

A remodelação óssea é um processo natural do organismo e deve ser mantida pelo equilíbrio entre reabsorção óssea pelos osteoclastos e aposição óssea

pelos osteoblastos<sup>4,5</sup>. O estímulo mecânico criado durante a movimentação dentária induzida altera esse equilíbrio, gerando padrões complexos de forças<sup>6</sup>, que resultam em duas áreas distintas: uma na qual predominam as forças de pressão, com maior atividade de osteoclastos e conseqüentemente maior reabsorção óssea; e outra onde predominam forças de tensão, aumento da atividade osteoblástica e maior aposição óssea<sup>3,4</sup>. Contudo, sabe-se atualmente que estas áreas de pressão e tensão podem ser encontradas dispostas conjuntamente em uma única face dentária<sup>7</sup>. Assim, torna-se fundamental avaliar as áreas de pressão e tensão de uma forma completa, considerando todas as faces (vestibular, palatina/lingual, mesial e distal), além de todos os níveis radiculares (apical, médio e cervical).

A resposta tecidual desencadeada pelas forças ortodônticas tem sido descrita por alguns pesquisadores como uma inflamação asséptica<sup>4,8,9</sup>, enquanto outros<sup>4,10</sup> contestam tal classificação, alegando que não se trata de um processo patológico por não apresentar todos os sinais clássicos da inflamação. Independente de constituir ou não uma inflamação, este processo tem mostrado que o estímulo mecânico desencadeia a liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas que estão envolvidas no recrutamento, diferenciação e ativação de osteoclastos<sup>3,5,11,12</sup>.

Recentemente demonstrou-se na movimentação ortodôntica em humanos uma maior expressão de citocinas pró-inflamatórias na área sob força de pressão, correlacionada com maior reabsorção óssea e atividade de osteoclastos<sup>13,14</sup>. As citocinas pró-inflamatórias ( IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e outras) desempenham um potente papel na reabsorção óssea depois da aplicação de força ortodôntica<sup>15,16,17</sup>, e tem sua secreção regulada na resposta inflamatória por diferentes populações de células como do sistema fagocitário mononuclear<sup>8</sup>.

Uma citocina pró-inflamatória de ação pouco compreendida na remodelação óssea é o IFN- $\gamma$ . Este mediador apresenta importante papel na regulação do processo inflamatório associado ao aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias e infiltrados de leucócitos. Entretanto, evidências recentes tem mostrado uma dupla função para o IFN- $\gamma$  na inflamação, sendo capaz de atuar tanto com função pró-inflamatória através da ativação de citocinas como IL-12, IL-15, TNF- $\alpha$ , e função anti-inflamatória inibindo a ação da IL-1 e IL-8 e induzindo a apoptose em leucócitos<sup>12,18</sup>.

Por outro lado, as citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e IL-13)<sup>19,20</sup> são

essencialmente orientadas para limitar a resposta inflamatória e evitar danos nos tecidos. Este processo ocorre pela diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, e pela inibição das funções de células efectoras e fagócitos mononucleares<sup>21</sup>. Portanto, parecem apresentar um papel protetor, inibindo a reabsorção óssea alveolar.

A expressão de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, inibe a reabsorção óssea alveolar e parece levar a uma regulação negativa da expressão de RANKL e M-CSF, e a um aumento na expressão de OPG<sup>14,22,23</sup>. Além da modulação dos sinalizadores disponíveis no microambiente, foi demonstrado *in vitro* que a IL-10 apresenta a capacidade de inibir a expressão de fatores de transcrição necessários à ativação dos osteoclastos, quando adicionada ao meio de cultura destas células, através de receptores para IL-10 expressos constitutivamente por estas células<sup>24</sup>.

Desta forma, o objetivo desta pesquisa é compreender melhor os mecanismos envolvidos no processo de remodelação óssea após a aplicação de forças ortodônticas sobre os dentes, por meio da quantificação da expressão de RNAm para os fatores IFN- $\gamma$  e IL-10 em diferentes áreas radiculares de dentes previamente indicados para extração, através de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostra**

Os pacientes incluídos neste estudo ou seus responsáveis assinaram o termo de consentimento informado (Apêndice 1), e a metodologia descrita a seguir foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR) (Processo n. PP/0167/09) (Anexo 1).

A amostra desta pesquisa consistiu no ligamento periodontal de 84 pré-molares de 33 pacientes (15 homens e 18 mulheres), com média de idade de 18,4 anos, agendados para tratamento ortodôntico na clínica de ortodontia da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Londrina, Paraná, Brasil. Os pacientes relacionados apresentaram indicação ortodôntica para exodontia dos primeiros ou segundos pré-molares, com base em exames clínicos e documentação ortodôntica realizados previamente ao início do tratamento.



Assim, a amostra foi dividida em 5 grupos: G1 (n=20, controle), dentes não submetidos a forças; G2 (n=13), dentes submetidos a forças ortodônticas durante 3 dias; G3 (n=14), dentes submetidos a forças ortodônticas durante 7 dias; G4 (n=23), dentes submetidos a forças ortodônticas durante 15 dias; e G5 (n=14), dentes submetidos a forças ortodônticas durante 21 dias.

Os critérios de inclusão foram os seguintes: (1) pacientes saudáveis sem evidências de diabetes *mellitus* ou osteoporose; (2) mulheres que não estivessem grávidas ou lactantes; (3) pacientes não poderiam ter utilizado antibióticos (pelo menos 3 meses antes do início do estudo), drogas anti-inflamatórias (1 mês antes do início do estudo), hormônios e outras drogas com terapias assistidas (6 meses antes do início dos estudos), pois estas drogas afetariam o metabolismo ósseo e a função imunológica<sup>13,14,25,26</sup>; (4) pacientes com boa saúde periodontal e nenhuma evidência radiográfica de perda óssea periodontal. Os itens de 1 a 3 foram obtidos por meio da anamnese.

Previamente às extrações, nos grupos 2, 3, 4 e 5 foram instalados aparelhos fixos convencionais pré-ajustados, prescrição Capelloza Padrão I, com canaleta de 0,022" x 0,030" (3M Unitek, Monrovia, Calif) e fios de níquel-titânio 0,014" ligados com amarrilhos metálicos, correspondendo à fase inicial de alinhamento e nivelamento do tratamento ortodôntico fixo. Com este procedimento, esperava-se a transmissão de uma força contínua e suave aos dentes.

### **Coleta da Amostra**

Os dentes foram extraídos seguindo os tempos de ativações determinadas: 0, 3, 7, 15 e 21 dias. O procedimento foi realizado por um profissional especialista em cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial, para evitar a destruição do ligamento periodontal na região cervical. O cirurgião realizou a assepsia da boca, anestesiou a região do pré-molar a ser extraído, removeu o fio de níquel-titânio e o braquete, houve a sindesmotomia e utilizou o fórceps nº150 (Quinelato, Rio Claro, São Paulo, Brasil) para fazer a luxação e a remoção do dente do alveolo dental<sup>27</sup>.

Imediatamente após as extrações dentárias, foi realizada a coleta do ligamento periodontal presente na superfície radicular de cada dente extraído, para posterior análise da expressão das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10. Para esta coleta, as superfícies radiculares foram divididas em faces vestibular, lingual, mesial e distal, e

subdivididas em regiões cervical, média e apical. Desta forma, cada dente extraído teve seu ligamento periodontal dividido em 12 partes, respectivamente. O ligamento periodontal foi removido da superfície radicular, por meio do uso de uma cureta periodontal de Gracey nº 5-6 e 7-8 (*Hu-Friedy, Chicago, Il, USA*), seguindo a face radicular e a divisão em terços. A ponta da cureta foi limpa com soro fisiológico e gaze a cada sítio diferente. A amostra de cada segmento coletado foi acondicionada em tubos tipo "eppendorf" com solução de *RNAlater*, a seguir, congelada em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior extração de RNA, de acordo com as recomendações do fabricante

**Figura 1 – Assepsia do paciente**



Fonte: Do autor

**Figura 2 – Anestesia na região pré-molar**



Fonte: Do autor

**Figura 3 – Remoção do braquete**



Fonte: Do autor

**Figura 4 – Sindesmotomia**



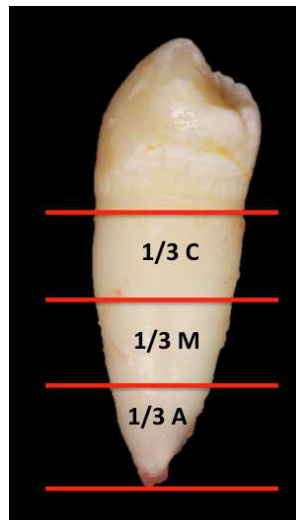
Fonte: Do autor

**Figura 5 – Exodontia com fórceps**



Fonte: Do autor

**Figura 6 – Divisão da raiz em terços**



Fonte: Do autor

**Figura 7 – Remoção do ligamento periodontal**



Fonte: Do autor

**Figura 8 - LP coletado e armazenado em "ependorf"**



Fonte: Do autor

Além da análise da expressão das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10, como variáveis secundárias, foram avaliadas na amostra a quantidade de apinhamento e a taxa de obesidade por meio do Índice de Massa Corporal (IMC). O apinhamento foi aferido em milímetros pelo somatório das medidas da largura mesiodistal dos dentes, da face mesial do primeiro molar de um lado até a face mesial do primeiro molar do outro lado (espaço requerido), e subtraindo o perímetro do arco (espaço presente)<sup>28</sup>. Para isso, utilizou-se um fio de latão 0,5 mm, o qual acomoda-se sobre a arcada dentária. O IMC foi calculado usando o peso em quilogramas dividido pela altura em metros ao quadrado, e o valor obtido foi analisado em relação à classificação do IMC (<18.5 abaixo do peso, 18.5-24.9 saudável, 25.0-29.9 sobrepeso, 30.0-39.9 obeso, > 40.0 obesidade mórbida)<sup>29</sup>.

Assim, este estudo dividiu a amostra em 12 áreas para quantificar o nível de expressão da IL-10 e IFN- $\gamma$ , sendo descrito neste trabalho apenas 6 áreas (face vestibular cervical, vestibular mediana, vestibular apical, lingual cervical, lingual mediana e lingual apical), uma vez que o movimento dentário analisado neste estudo foi de inclinação, promovendo diferentes áreas de pressão e tensão nas faces vestibular e palatina/lingual<sup>30</sup>.

## Análise Bioquímica

Para avaliação da expressão das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 na movimentação ortodôntica, a amostra foi submetida à extração de RNA e PCR em tempo real. A amostra foi congelada em nitrogênio líquido, mecanicamente fragmentada e homogeneizada em água *Milli-Q* com *Ultra Turrax (IKA, Germany)*, e submetida à extração de RNA. Para extração do RNA total dos fragmentos foi utilizado reagente *Trizol*, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (*Life Technologies, Rockville, MD, USA*)<sup>31-33</sup>, na proporção de 1 ml de *Trizol* para 1 mg de tecido, sendo agitado por 30 s e deixado à temperatura ambiente por 5 min. Para cada 1 ml da suspensão, foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio (*Sigma, St Louis, MO, USA*), sendo então a amostra centrifugada a 13.000 rpm por 15 min a 4 °C. A fase aquosa (camada superior) foi transferida para um tubo novo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, sofrendo agitação em vortex e incubado por 20 min a -20 °C para precipitar o RNA da fase aquosa. Novamente, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em etanol 100 %. Para permitir a secagem da amostra, os tubos foram invertidos sobre um papel de filtro e deixados em temperatura ambiente por 5 min dentro de uma capela de fluxo laminar vertical (para impedir contaminação das amostras). Para redissolver o RNA total, a amostra foi suspensa em 50  $\mu$ l de água deionizada e livre de RNase, sendo então armazenada a -70 °C. Uma alíquota de 5  $\mu$ l foi utilizada para determinar a concentração de RNA/ $\mu$ l na amostra, usando o aparelho *GeneQuant (Pharmacia Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)*. O DNA complementar (DNAc) foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa, com a utilização de uma transcriptase reversa (*Superscript III – Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA*) utilizando 5  $\mu$ g de RNA total e tendo como volume final de reação 200  $\mu$ l.

Uma vez confirmada a positividade da detecção de beta-actina por RT-PCR, bem como a integridade da amostra, a expressão quantitativa dos genes das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 no ligamento periodontal foi analisada por meio de reações de RT-PCR, utilizando-se o sistema *SYBRGreen (Applied Biosystems, Warrington, UK)* em um aparelho *ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, UK)*. A sequência de *primers* humanos foi

determinada com o programa *PrimerExpress 3.0* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), usando sequências de nucleotídeos presentes no banco de dados da *GenBank*<sup>31-34</sup>. Esse sistema realiza as reações de amplificação e detecção e quantifica as amostras (*ABI Prism Software*) através de nucleases fluorogênicas utilizadas na reação, sendo tal expressão normalizada com base em controles endógenos. O DNA complementar sintetizado a partir do RNA mensageiro foi utilizado juntamente com reagentes *SYBRGreen PCR MasterMix* (*Applied Biosystems*), como determinado pelo fabricante. A reação compreende 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95 °C, em seguida quarenta ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, além de um ciclo final e vinte minutos, com temperatura crescente de 60 °C a 95 °C foi empregada para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação. Os resultados foram analisados com base no valor de *Ct* (*cycle threshold*) ou ciclo limiar, definido após a reação, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos aonde a amplificação atinge um dado limiar, que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Para a análise do RNAm, o nível relativo da expressão do gene foi normalizado com os níveis da  $\beta$ -actina usando o ciclo limiar (*Ct*)<sup>31-34</sup>.

### **Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada no programa *GraphPad Prism 6.0*. Para todos os testes aplicados adotou-se um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Após teste de normalidade de Shapiro-Wilk, os dados foram descritos pelos parâmetros de mediana e intervalo interquartilico (1º. Q. – 3º. Q). Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn para comparar os níveis das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 dos diferentes grupos, nas diferentes regiões. Para verificar a correlação entre os níveis do IFN- $\gamma$  e IL-10 nas áreas de tensão, pressão e região intermediária utilizou-se o teste de Correlação de Spearman. Para comparar as variáveis secundárias (IMC e apinhamento) entre os grupos, utilizou-se o teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Para verificar a influência das variáveis secundárias sobre a expressão das citocinas avaliadas utilizou-se o teste de Correlação de Spearman.

## RESULTADOS

Com relação à expressão das citocinas IFN- $\gamma$  (Tabela 1) e IL-10 (Tabela 2), foram observados níveis estatisticamente mais altos nos grupos G2, G3 e G4 em comparação aos grupos G1 e G5 ( $p=0,0001$ ), nas diferentes regiões da raiz dentária. Além disso, os níveis dessas citocinas no G2 foram estatisticamente similares aos do G3 e G4. Contudo, o grupo G3 apresentou níveis estatisticamente maiores que o G4.

**Tabela 1.** Distribuição dos níveis de IFN- $\gamma$  nas diferentes regiões radiculares (VC vestibulo-cervical, VM vestibulo-mediano, VA vestibulo-apical, LA lingual-apical, LM lingual-mediana, LC lingual-cervical) para os grupos G1 a G5: Mediana, 1<sup>o</sup>-3<sup>o</sup> Q e teste de Kruskal-Wallis ( $p$ ), seguido pelo pós-teste de Dunn

Região	G1 (Controle)	G2 (3 d.)	G3 (7 d.)	G4 (15 d.)	G5 (21 d.)	p
VC	0,16 (0,14-0,22) <sup>a</sup>	5,90 (5,02 - 6,17) <sup>b,c</sup>	7,17 (6,73 - 8,09) <sup>b</sup>	2,16 (1,79 - 2,96) <sup>c</sup>	0,23 (0,18 - 0,36) <sup>a</sup>	0,0001*
VM	0,18 (0,14-0,22) <sup>a</sup>	4,50 (3,64- 5,28) <sup>b,c</sup>	6,09 (4,94 - 6,49) <sup>b</sup>	2,02 (1,16 - 2,40) <sup>c</sup>	0,26 (0,15 - 0,36) <sup>a</sup>	0,0001*
VA	0,20 (0,14-0,24) <sup>a</sup>	3,21 (2,82- 3,64) <sup>b,c</sup>	3,83 (3,14- 4,58) <sup>b</sup>	1,33 (0,98 -1,96) <sup>c</sup>	0,20 (0,16 - 0,27) <sup>a</sup>	0,0001*
LA	0,19 (0,15-0,22) <sup>a</sup>	5,81 (4,47- 6,20) <sup>b,c</sup>	6,94 (6,58 - 7,95) <sup>b</sup>	2,4 (1,76 - 2,86) <sup>c</sup>	0,24 (0,15 - 0,31) <sup>a</sup>	0,0001*
LM	0,18 (0,15-0,19) <sup>a</sup>	3,91 (3,12 - 4,99) <sup>b,c</sup>	4,91 (4,48 - 6,19) <sup>b</sup>	1,63 (1,34 - 2,05) <sup>c</sup>	0,28 (0,17- 0,32) <sup>a</sup>	0,0001*
LC	0,19 (0,17-0,24) <sup>a</sup>	3,11 (2,90 - 3,58) <sup>b,c</sup>	3,97 (3,41- 4,15) <sup>b</sup>	1,32 (1,11-1,53) <sup>c</sup>	0,23 (0,20 - 0,27) <sup>a</sup>	0,0001*

\* Estatisticamente significante

Letras diferentes indicam que os grupos são diferentes estatisticamente

Fonte: Do autor

**Tabela 2 -** Distribuição dos níveis de IL-10 nas diferentes regiões radiculares (VC: vestibulo-cervical, VM: vestibulo-mediano, VA: vestibulo-apical, LA: lingual-apical, LM: lingual-mediana, LC: lingual-cervical) para os grupos G1 a G5: Mediana, 1<sup>o</sup>-3<sup>o</sup> Q e teste de Kruskal-Wallis ( $p$ ), seguido pelo pós-teste de Dunn

Região	G1 (Controle)	G2 (3 d.)	G3 (7 d.)	G4 (15 d.)	G5 (21 d.)	p
VC	0,20 (0,15-0,24) <sup>a</sup>	5,02 (4,39-5,33) <sup>b,c</sup>	5,96 (5,58-7,32) <sup>b</sup>	2,48 (2,11-3,25) <sup>c</sup>	0,26 (0,18-0,33) <sup>a</sup>	0,0001*
VM	0,19 (0,15-0,21) <sup>a</sup>	2,91 (2,31-4,50) <sup>b,c</sup>	4,49 (4,33-5,09) <sup>b</sup>	1,54 (1,20-2,05) <sup>c</sup>	0,22 (0,19-0,25) <sup>a</sup>	0,0001*
VA	0,20 (0,17-0,31) <sup>a</sup>	3,67 (2,90-4,45) <sup>b,c</sup>	4,26 (4,04-4,92) <sup>b</sup>	1,42 (1,14-1,54) <sup>c</sup>	0,23 (0,20-0,25) <sup>a</sup>	0,0001*
LA	0,20 (0,14-0,34) <sup>a</sup>	4,59 (4,12-5,39) <sup>b,c</sup>	6,17 (4,73-8,09) <sup>b</sup>	3,40 (1,79-3,94) <sup>c</sup>	0,23 (0,17-0,30) <sup>a</sup>	0,0001*
LM	0,21 (0,18-0,31) <sup>a</sup>	4,54 (4,24-5,38) <sup>b,c</sup>	5,42 (5,13-5,94) <sup>b</sup>	3,03 (1,45-3,40) <sup>c</sup>	0,30 (0,19-0,41) <sup>a</sup>	0,0001*
LC	0,21 (0,18-0,24) <sup>a</sup>	2,27 (2,14-2,92) <sup>b,c</sup>	2,87 (2,37-4,57) <sup>b</sup>	1,40 (0,98-1,94) <sup>c</sup>	0,21 (0,14-0,24) <sup>a</sup>	0,0001*

\* Estatisticamente significante

Letras diferentes indicam que os grupos são diferentes estatisticamente

Fonte: Do autor

Na análise da relação entre os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10, não foi verificada correlação entre os níveis destas citocinas nas áreas de tensão, pressão e região intermediária. Entretanto, foi observada correlação inversa entre os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10 nas áreas de pressão no grupo de 7 dias (Tabela 3). Este dado demonstra que na área de pressão há uma suave tendência de uma maior expressão do nível de IFN- $\gamma$  em relação a IL-10.

**Tabela 03** - Avaliação da correlação entre os níveis de Interferon-Gama e Interleucina-10 nas diferentes regiões e diferentes grupos.

Grupos		Área de Tensão			Área de Pressão			Área Intermediária		
		Média $\pm$ DP	rS	p	Média $\pm$ DP	rS	p	Média $\pm$ DP	rS	p
3 d.	INF-Gama	3,26 $\pm$ 0,68	-0,20	0,32	5,5 $\pm$ 0,86	0,02	0,91	4,19 $\pm$ 1,06	-0,38	0,05
	IL-10	3,08 $\pm$ 1,06			4,53 $\pm$ 1,2			3,87 $\pm$ 1,43		
7 d.	INF-Gama	4,08 $\pm$ 1,06	-0,07	0,71	7,24 $\pm$ 0,95	-0,38	0,04*	5,50 $\pm$ 1,21	-0,03	0,87
	IL-10	3,92 $\pm$ 1,25			6,37 $\pm$ 1,44			4,99 $\pm$ 1,06		
15 d.	INF-Gama	1,49 $\pm$ 0,72	-0,03	0,81	2,39 $\pm$ 0,78	0,21	0,16	1,86 $\pm$ 0,72	-0,04	0,74
	IL-10	1,55 $\pm$ 0,75			2,84 $\pm$ 1,02			2,14 $\pm$ 0,97		

\* Estatisticamente significante

Fonte: Do autor

Não foram observadas diferenças na distribuição do gênero nos diferentes grupos experimentais (Teste do Qui Quadrado,  $p=0,20$ ). As demais variáveis (IMC e apinhamento) foram analisadas pelo teste ANOVA, com pós-teste de Bonferroni (Tabela 4).

**Tabela 4** - IMC e apinhamento nos diferentes grupos experimentais.

Variáveis	G1 (Controle)	G2 (3 d)	G3 (7 d)	G4 (15 d)	G5 (21 d)	p
IMC	20,6 $\pm$ 3,3 <sup>a,b</sup>	17,3 $\pm$ 0,6 <sup>a,c</sup>	23,2 $\pm$ 2,9 <sup>a,b</sup>	22,9 $\pm$ 4,2 <sup>a,b</sup>	22,9 $\pm$ 5,4 <sup>a,b</sup>	0,01*
Apinhamento	4,9 $\pm$ 2,4 <sup>a,c</sup>	5,0 $\pm$ 2,7 <sup>a,b</sup>	8,7 $\pm$ 4,0 <sup>b</sup>	4,4 $\pm$ 3,2 <sup>c</sup>	1,7 $\pm$ 1,7 <sup>c</sup>	0,01*

\* Estatisticamente significante, ANOVA (Pós-teste: Bonferroni)

Letras diferentes indicam que os grupos são diferentes estatisticamente

Fonte: Do autor

Apesar das diferenças observadas entre os grupos para as variáveis IMC e apinhamento, não foi observada associação entre essas variáveis e os níveis IFN- $\gamma$  ou IL-10 (IMC: Correlação de Spearman,  $p>0,05$ ; Severidade do apinhamento: Correlação de Spearman,  $p>0,05$ ).



## DISCUSSÃO

Liberadas durante a movimentação dentária, as citocinas estimulam as células ósseas e do ligamento periodontal a uma resposta inflamatória seguida de osteoclastogênese e reabsorção óssea na área de pressão, e nova formação óssea pelos osteoblastos na área de tensão do ligamento periodontal<sup>3,4,9,12,35</sup>. Apesar deste mecanismo já ser conhecido<sup>3,16,36-39</sup>, há uma carência de estudos clínicos<sup>13,14,19</sup> à cerca da expressão da IL-10 e do IFN- $\gamma$  durante a movimentação ortodôntica.

O presente estudo constatou que o IFN- $\gamma$  estava presente no ligamento periodontal de dentes submetidos à movimentação ortodôntica, e sua expressão foi estatisticamente maior nos grupos G2, G3 e G4 em comparação aos grupos G1 e G5 ( $p=0,0001$ ), nas diferentes regiões da raiz dentária (TABELA 1). Isto provavelmente se deve ao fato de que após 24 horas da aplicação de força ocorre uma compressão das fibras do ligamento periodontal, que promovem a deteriorização tecidual, desintegração de vasos sanguíneos, levando a uma isquemia e hipóxia da região<sup>3</sup>. Estas alterações desencadeiam uma resposta inflamatória aguda, caracterizada por vasodilatação e migração de leucócitos para fora dos capilares do ligamento periodontal<sup>3</sup>, promovendo uma maior atividade fagocitária que é estimulada pelo IFN- $\gamma$  através de quimioatração de linfócitos tipo Th-1 e macrófagos para remoção do tecido necrótico<sup>32</sup>. Por outro lado, os níveis de IFN- $\gamma$  no G2 foram similares aos grupos G3 e G4 (Tabela 1). Os resultados demonstraram que de 0 (G1) a 7 dias (G3) de ativação houve um aumento progressivo da expressão do IFN- $\gamma$ , e os níveis foram reduzidos a partir de 15 dias (G4), chegando a valores semelhantes ao grupo controle em 21 dias (G5).

Estes resultados corroboram com o estudo de Alhashimi et al<sup>40</sup>, que investigaram em animais os efeitos do IFN- $\gamma$ , IL4 e IL-10 e verificaram que a taxa de IFN- $\gamma$  foi significativamente mais elevada no lado experimental (lado de pressão) do que no lado de controle contralateral para 3, 7 e 10 dias. No presente estudo, o G5 foi estatisticamente semelhante ao G1, pois a partir deste período inicia a fase de aceleração da movimentação dentária (*postlag phase*), onde mediadores inflamatórios produzidos por macrófagos como IL-1 e TNF- $\alpha$  induzem a reabsorção óssea pela promoção da diferenciação e maturação dos osteoclastos<sup>41,42</sup>.

Como a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória orientada para limitar a resposta inflamatória e evitar danos nos tecidos, esta ação pode ser obtida por meio

da diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, como também inibindo funções das células T e fagócitos mononucleares<sup>43</sup>, suprimindo a reabsorção óssea<sup>42</sup>. Os níveis estatisticamente mais altos de expressão da IL-10 nos grupos G2, G3 e G4 em comparação aos grupos G1 e G5 ( $p=0,0001$ ), devem-se provavelmente a maior concentração de citocinas pró-inflamatórias nestes grupos em relação ao G1<sup>13,14,16,17,26,40,44</sup> e G5<sup>16,17,26,40,44</sup>. Por outro lado, os níveis de IL-10 no G2 foram similares aos grupos G3 e G4 (Tabela 2), dados semelhantes ao nível de expressão do IFN- $\gamma$ . Ao contrário, o estudo de Alhashimi et al<sup>40</sup> não observou expressão de IL-10 e IL-4, tanto no lado experimental (lado de pressão) quanto no lado controle, independente do período experimental.

O alto nível de IL-10 nesta fase entre G2 e G4 (3 a 15 dias após ativação) pode ser explicado pela necessidade de uma maior atividade fagocitária para remoção de tecidos necróticos. Esta região atrai uma grande quantidade de células fagocitárias por meio de quimioatração<sup>13</sup>, e entre estas células, os macrófagos, além do subconjunto de células T (Th2, Tc2, Tr1), monócitos e células B, são produtores de IL-10<sup>24,45</sup>. Outra hipótese para esta alta taxa de IL-10 neste período é que ela inibe diretamente a proliferação de células CD4<sup>+</sup> e a produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-5 e TNF- $\alpha$ , conseqüentemente dificultando a resposta imune celular, e regulando o desequilíbrio Th1/Th2<sup>46</sup>. Garlet et al. também observaram um aumento de IL-10 no grupo experimental em relação ao grupo controle<sup>14</sup>. A redução do nível de IL-10 no período de 21 dias (G5) de ativação, semelhante ao período inicial do estudo (G1), pode ser explicado pelo início da fase de aceleração da movimentação ortodôntica, com diminuição da área de hialinização e da incidência de células fagocitárias<sup>3</sup> produtoras de IL-10<sup>21,45</sup>, restabelecendo o equilíbrio entre a reabsorção óssea e aposição<sup>47</sup>.

No tocante aos resultados da análise da relação entre os níveis de IFN- $\gamma$  e a IL-10 nas áreas de tensão, pressão e região intermediária (Tabela 3), não foi verificada nenhuma correlação entre as citocinas, mas foi observado uma relação inversa entre os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10 nas áreas de pressão no G3 (Tabela 3). Estes dados demonstram uma tendência suave de maior expressão do nível de IFN- $\gamma$  em relação a IL-10, como também encontrado no estudo em animais de Alhashimi et al<sup>40</sup> que verificaram que a taxa de IFN- $\gamma$  foi mais elevada no lado de pressão (lado experimental) e não observaram a expressão de IL-10 nesta mesma área. No estudo clínico de Garlet et al<sup>31</sup> avaliando IL-10, TNF- $\alpha$  (citocina pró-inflamatória) e RANKL

(fator osteoclastogênico), também não encontraram nenhuma correlação entre IL-10 e TNF- $\alpha$ . Entretanto houve uma correlação inversa entre IL-10 e RANKL na área de tensão.

No que se refere às variáveis secundárias (IMC e severidade de apinhamento), apesar dos grupos não se mostrarem compatíveis, os resultados demonstraram que as diferenças existentes na amostra não foram determinantes para a alteração dos níveis de expressão da IL-10 e do IFN- $\gamma$  (Tabela 3). O IMC foi investigado e comparado entre os grupos porque a literatura relata que mudanças hormonais associadas à obesidade podem afetar a terapia ortodôntica<sup>29</sup>, por meio do hormônio leptina, o qual atua causando uma diminuição do *turnover* ósseo<sup>48</sup>. Considerando o IMC, a não alteração nos níveis de expressão de RNAm das citocinas avaliadas no presente estudo pode ser explicada pela inclusão de pacientes com peso saudável. No que se refere à severidade do apinhamento, mesmo a amostra possuindo alguns indivíduos com arcadas dentárias alinhadas e outros com apinhamento, este fator pode não ter alterado a expressão das citocinas investigadas porque observou-se apenas a fase inicial de nivelamento, isto é, a utilização de fio níquel-titânio .014", o qual libera quantidade de força bastante suave, independente de sua deflexão<sup>49,50</sup>.

A amostra utilizada neste estudo (33 pacientes, 84 pré-molares) é bastante expressiva em relação aos estudos prévios descritos na literatura, os quais utilizaram menos pacientes (10 a 26 pacientes) e menos dentes (12 a 64 pré-molares)<sup>17,26,27,31,32</sup>. Ainda, é importante destacar que este estudo utilizou ligamento periodontal removido da superfície radicular, o qual permitiu avaliar níveis de marcadores biológicos produzidos em pequenas quantidades, pois não sofrem diluição como no caso de amostras do fluido gengival crevicular e de saliva<sup>51</sup>. Além disso, permitem quantificar níveis de RNAm de moléculas inflamatórias de áreas específicas, como lado de pressão e o lado de tensão<sup>52</sup>. Assim, este estudo dividiu a amostra em 12 áreas para quantificar o nível de expressão do IFN- $\gamma$  e IL-10, sendo descrito neste trabalho apenas 6 áreas (face vestibular cervical, vestibular mediana, vestibular apical, lingual cervical, lingual mediana e lingual apical), uma vez que o movimento dentário analisado neste estudo foi de inclinação, promovendo diferentes áreas de pressão e tensão nas faces vestibular e palatina/lingual<sup>30</sup>. O estudo de von Bohl *et al*<sup>53</sup>, apoiado na hipótese de reabsorção e aposição óssea de Melsen *et al*<sup>54</sup>, observou a flexão do osso alveolar para lingual e para bucal como uma reação às

forças ortodônticas que induziu a hialinização nestes locais. Ao mesmo tempo, houve uma redução da tensão normal às fibras do ligamento periodontal na região central da raiz, levou a direcionar a reabsorção óssea.

Os critérios de inclusão foram os mesmos adotados por estudos semelhantes<sup>13,14,27</sup> que utilizaram exodontias de pré-molares, com alguma variação no tempo de uso de antibióticos (3 a 6 meses) e drogas anti-inflamatórias (1 a 6 meses)<sup>13,14,16,19,25,26,44,47,51,55-59</sup>. O pré-molar foi escolhido para este estudo por estar indicado para extração na maioria dos tratamentos ortodônticos que necessitem de espaço para correção do apinhamento, biprotrusão e deficiências de dimensões anteroposteriores<sup>13,14,16,19,25-27,55,56,59-62</sup>.

A maioria dos tratamentos ortodônticos corretivos inicia-se com a fase de alinhamento e nivelamento, utilizando arco níquel-titânio redondo, o qual possui alta elasticidade e libera uma força suave e contínua, criando um estímulo mecânico para a movimentação de dentes com discrepâncias no posicionamento horizontal, vertical e rotacional<sup>49,50</sup>. Neste estudo, avaliou-se esta fase clínica do tratamento pelo uso de fio de níquel-titânio .014", ligado com amarrilhos metálicos ao aparelho fixo, mantendo o fio dentro da canaleta do braquete e diminuindo o atrito<sup>50,63,64</sup>. Alguns estudos aplicaram força suave e contínua, mas usando mecanismos ortodônticos seccionados<sup>6,25,61,62</sup>. Outros aplicaram força intensa com a utilização de aparelho para disjunção palatina<sup>13,14</sup>. Quanto à intensidade da força, alguns estudos<sup>65-67</sup> observaram que não há uma diferença na taxa de movimentação ortodôntica entre o estímulo de uma força suave ou intensa, mas quanto a quantidade de hialinização houve uma diferença significativa para as forças intensas. Quando se inicia a movimentação ortodôntica com forças suaves e se aumenta gradualmente sua intensidade, o resultado é um maior recrutamento de osteoclastos com menos hialinização e um movimento dentário efetivo<sup>66</sup>. O estudo de Luppapornlarp *et al*<sup>25</sup> demonstrou que forças contínuas suaves induziram o movimento de canino similar a força contínua intensa, mas com menos dor.

A escolha destes períodos de ativação dos dentes, sendo 0 o período sem ativação, 3 dias, 7 dias, 15 dias e 21 dias de ativação pelo aparelho ortodôntico, está relacionado ao nível das citocinas, que normalmente é aumentado nos estágios iniciais e diminui após 10 dias<sup>37</sup>, e também pelas três fases do movimento ortodôntico<sup>3,51,66,68-70</sup>, sendo a primeira fase a inicial caracterizada por um movimento rápido imediatamente após a aplicação da força sobre o dente, depois vem fase do

período de latência com baixas taxas de deslocamento ou nenhum deslocamento produzido pela hialinização do ligamento periodontal em áreas de pressão, e a terceira fase na qual a taxa de movimento aumenta gradualmente ou de repente. Cada uma destas três fases é determinada por uma reação bioquímica, celular, e tecidual específica envolvendo o recrutamento de precursores de osteoblastos e osteoclastos, como também, a extravasamento e quimiotaxia de células inflamatórias<sup>3</sup>. Alguns estudos clínicos mostram a associação do nível das citocinas com as fases do movimento ortodôntico<sup>13,14,17,26</sup> usando ligamento periodontal de pré-molares ou fluido gengival crevicular.

O método utilizado neste estudo para determinar a expressão de RNAm das citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$  foi o *RT-PCR*, que pode ser considerado um dos métodos mais sensíveis, eficientes, rápidos e reprodutíveis para medir a expressão de genes<sup>13,14,71,72</sup>. Mas há estudos que utilizam outros métodos para avaliar a expressão de citocinas e outros mediadores, como o ELISA<sup>26,44,51,56,59,60</sup>, *PCR* (reação em cadeia polimerase)<sup>71</sup>, radioimunoensaio<sup>57</sup>, imunoensaio multiplexado<sup>17,73</sup>, ensaio BCA<sup>25</sup>, imunoensaio<sup>16,19</sup>.

Os dados encontrados no presente estudo evidenciam a presença de IL-10 e o IFN- $\gamma$  na fase inicial e de hialinização da movimentação ortodôntica, com níveis de expressão semelhantes nas áreas de pressão e tensão, como também em áreas intermediárias. Contudo não foi conclusivo para esclarecer suas ações citadas na literatura.

A ação do IFN- $\gamma$  de estimular a atividade fagocitária<sup>32</sup>, pode no futuro, ter seu uso na diminuição do período de hialinização; como também na aceleração da movimentação ortodôntica, através do sinergismo com outras citocinas próinflamatórias estimulando a reabsorção óssea. Contudo, os resultados do presente estudo não suportaram uma atividade anti-osteoclástica sugerida por alguns autores<sup>74,75</sup>, os quais afirmam que esta citocina poderia promover ancoragem durante a movimentação dentária.

Em relação a IL-10, seus níveis semelhantes ao IFN- $\gamma$  nos mesmos períodos confirmam sua principal ação anti-inflamatória, que é de suprimir a reabsorção óssea<sup>14</sup>, podendo ser usada como um mecanismo de ancoragem na movimentação dentária e também na proteção dos tecidos periodontais em pacientes com periodonto diminuído e que necessitam de tratamento ortodôntico.

## REFERÊNCIAS

1. Saddi KR, Alves GD, Paulino TP, Ciancaglini P, Alves JB. Epidermal growth factor in liposomes may enhance osteoclast recruitment during tooth movement in rats. *Angle Orthod.* 2008 Jul;78(4):604-9.
2. Koyama Y, Mitsui N, Suzuki N, Yanagisawa M, Sanuki R, Isokawa K, et al. Effect of compressive force on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in osteoblastic Saos-2 cells. *Arch Oral Biol.* 2008 May;53(5):488-96.
3. 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.
4. Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod.* 2006 Jun;28(3):221-40.
5. Tanaka Y, Nakayamada S, Okada Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005 Jun;4(3):325-8.
6. Cattaneo PM, Dalstra M, Melsen B. The finite element method: a tool to study orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2005 May;84(5):428-33.
7. Oltramari PV, de Lima Navarro R, Henriques JF, Taga R, Cestari TM, Ceolin DS, et al. Orthodontic movement in bone defects filled with xenogenic graft: an experimental study in minipigs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007 Mar;131(3):302 e10-7.
8. Baba S, Kuroda N, Arai C, Nakamura Y, Sato T. Immunocompetent cells and cytokine expression in the rat periodontal ligament at the initial stage of orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol.* 2011 May;56(5):466-73.
9. Krishnan V, Davidovitch Z. On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2009 Jul;88(7):597-608.
10. Pinkerton MN, Wescott DC, Gaffey BJ, Beggs KT, Milne TJ, Meikle MC. Cultured human periodontal ligament cells constitutively express multiple osteotropic cytokines and growth factors, several of which are responsive to mechanical deformation. *J Periodontal Res.* 2008 Jun;43(3):343-51.
11. Masella RS, Meister M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006 Apr;129(4):458-68.
12. Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J et al. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:33-63.
13. Garlet TP, Coelho U, Repeke CE, Silva JS, Cunha Fde Q, Garlet GP. Differential expression of osteoblast and osteoclast chemoattractants in compression and tension sides during orthodontic movement. *Cytokine.* 2008 Jun;42(3):330-5.

14. 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.
15. 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.
16. 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 Jul;130(1):7 e1-6.
17. 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.
18. Jansen RG, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. Interferon-gamma-loaded collagen scaffolds reduce myofibroblast numbers in rat palatal mucosa. *Eur J Orthod.* 2011 Feb;33(1):1-8.
19. Kaya FA, Hamamci N, Basaran G, Dogru M, Yildirim TT. TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  and IL-8 levels in tooth early levelling movement orthodontic treatment. *Journal of International Dental And Medical Research.* 2010;3(3):116-21.
20. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:217-42.
21. Dennis VA, Jefferson A, Singh SR, Ganapamo F, Philipp MT. Interleukin-10 anti-inflammatory response to *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease: a possible role for suppressors of cytokine signaling 1 and 3. *Infect Immun.* 2006 Oct;74(10):5780-9.
22. Hu KF, Huang KC, Ho YP, Lin YC, Ho KY, Wu YM, et al. Interleukin-10 (-592 C/A) and interleukin-12B (+16974 A/C) gene polymorphisms and the interleukin-10 ATA haplotype are associated with periodontitis in a Taiwanese population. *J Periodontal Res.* 2009 Jun;44(3):378-85.
23. Liu D, Yao S, Wise GE. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. *Eur J Oral Sci.* 2006 Feb;114(1):42-9.
24. Mohamed SG, Sugiyama E, Shinoda K, Taki H, Hounoki H, Abdel-Aziz HO, et al. Interleukin-10 inhibits RANKL-mediated expression of NFATc1 in part via suppression of c-Fos and c-Jun in RAW264.7 cells and mouse bone marrow cells. *Bone.* 2007 Oct;41(4):592-602.
25. Luppapanornlarp S, Kajii TS, Surarit R, Iida J. Interleukin-1beta levels, pain intensity, and tooth movement using two different magnitudes of continuous orthodontic force. *Eur J Orthod.* 2010 Oct;32(5):596-601.
26. Madureira DF, Taddei Sde A, Abreu MH, Pretti H, Lages EM, da Silva TA. Kinetics of interleukin-6 and chemokine ligands 2 and 3 expression of periodontal

tissues during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2012 Oct;142(4):494-500.

27. Chutimanutskul W, Ali Darendeliler M, Shen G, Petocz P, Swain MV. Changes in the physical properties of human premolar cementum after application of 4 weeks of controlled orthodontic forces. *Eur J Orthod.* 2006 Aug;28(4):313-8.

28. Fleming PS, DiBiase AT, Sarri G, Lee RT. Comparison of mandibular arch changes during alignment and leveling with 2 preadjusted edgewise appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009 Sep;136(3):340-7.

29. Neeley WW, 2nd, Gonzales DA. Obesity in adolescence: implications in orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007 May;131(5):581-8.

30. von Bohl M, Kuijpers-Jagtman AM. Hyalinization during orthodontic tooth movement: a systematic review on tissue reactions. *Eur J Orthod.* 2009 Feb;31(1):30-6.

31. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol.* 2007 Jan;147(1):128-38.

32. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Garlet TP, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microbes Infect.* 2008 Apr;10(5):489-96.

33. Repeke CE, Ferreira SB, Jr., Claudino M, Silveira EM, de Assis GF, Avila-Campos MJ, et al. Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. *Bone.* 2010 Apr;46(4):1122-30.

34. Garlet GP, Martins W, Jr., Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2004 Aug;31(8):671-9.

35. Andrade I, Jr., Taddei SRA, Souza PEA. Inflammation and tooth movement: the role of cytokines, chemokines, and growth factors. *Seminars in Orthodontics.* 2012 december;18(4):257-69.

36. Davidovitch Z. Tooth movement. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2(4):411-50.

37. Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL. Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dent Clin North Am.* 1988 Jul;32(3):411-35.

38. Yamaguchi M. RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res.* 2009 May;12(2):113-9.

39. Yamaguchi M, Nakajima R, Kazutaka K. Mechanoreceptors, nociceptors, and orthodontic tooth movement. *Seminars in Orthodontics.* 2012 December;18(4):249-



56.

40. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M. Orthodontic movement induces high numbers of cells expressing IFN-gamma at mRNA and protein levels. *J Interferon Cytokine Res.* 2000 Jan;20(1):7-12.

41. Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes Infect.* 2000 Aug;2(10):1181-92.

42. Garlet GP, Avila-Campos MJ, Milanezi CM, Ferreira BR, Silva JS. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Microbes Infect.* 2005 Apr;7(4):738-47.

43. Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res.* 1999 Jun;19(6):563-73.

44. Tuncer BB, Ozmeric N, Tuncer C, Teoman I, Cakilci B, Yucel A, et al. Levels of interleukin-8 during tooth movement. *Angle Orthod.* 2005 Jul;75(4):631-6.

45. Passoja A, Puijola I, Knuuttila M, Niemela O, Karttunen R, Raunio T, et al. Serum levels of interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2010 Oct;37(10):881-7.

46. Su DL, Lu ZM, Shen MN, Li X, Sun LY. Roles of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of SLE. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:347141.

47. 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.

48. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell.* 2000 Jan 21;100(2):197-207.

49. Franchi L, Baccetti T. Forces released during alignment with a preadjusted appliance with different types of elastomeric ligatures. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006 May;129(5):687-90.

50. Fuck LM, Drescher D. Force systems in the initial phase of orthodontic treatment -- a comparison of different leveling arch wires. *J Orofac Orthop.* 2006 Jan;67(1):6-18.

51. Florez-Moreno GA, Marin-Restrepo LM, Isaza-Guzman DM, Tobon-Arroyave SI. Screening for salivary levels of deoxypyridinoline and bone-specific alkaline phosphatase during orthodontic tooth movement: a pilot study. *Eur J Orthod.* 2012 Jan 12.

52. Ren Y, Vissink A. Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. *Eur J Oral Sci.* 2008 Apr;116(2):89-97.

53. von Bohl M, Maltha J, Von den Hoff H, Kuijpers-Jagtman AM. Changes in the periodontal ligament after experimental tooth movement using high and low continuous forces in beagle dogs. *Angle Orthod.* 2004 Feb;74(1):16-25.
54. Melsen B. Biological reaction of alveolar bone to orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 1999 Apr;69(2):151-8.
55. Barbieri G, Solano P, Alarcón JA, Vernal R, Rios-Lugo J, Sanz M, et al. Biochemical markers of bone metabolism in gingival crevicular fluid during early orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 2013 Jan;83(1):63-9.
56. 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.
57. 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.
58. Rhee SH, Kang J, Nahm DS. Cystatins and cathepsin B during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009 Jan;135(1):99-105.
59. Toygar HU, Kircelli BH, Bulut S, Sezgin N, Tasdelen B. Osteoprotegerin in gingival crevicular fluid under long-term continuous orthodontic force application. *Angle Orthod.* 2008 Nov;78(6):988-93.
60. Iwasaki LR, Chandler JR, Marx DB, Pandey JP, Nickel JC. IL-1 gene polymorphisms, secretion in gingival crevicular fluid, and speed of human orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res.* 2009 May;12(2):129-40.
61. Owman-Moll P, Kurol J, Lundgren D. Continuous versus interrupted continuous orthodontic force related to early tooth movement and root resorption. *Angle Orthod.* 1995;65(6):395-401; discussion -2.
62. Owman-Moll P, Kurol J, Lundgren D. Effects of a doubled orthodontic force magnitude on tooth movement and root resorptions. An inter-individual study in adolescents. *Eur J Orthod.* 1996 Apr;18(2):141-50.
63. Florez-Moreno GA, Isaza-Guzman DM, Tobon-Aroyave SI. Time-related changes in salivary levels of the osteotropic factors sRANKL and OPG through orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2013 Jan;143(1):92-100.
64. Perinetti G, Varvara G, Salini L, Tete S. Alkaline phosphatase activity in dental pulp of orthodontically treated teeth. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2005 Oct;128(4):492-6.
65. 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.
66. Tomizuka R, Shimizu Y, Kanetaka H, Suzuki A, Urayama S, Kikuchi M, et al.

Histological evaluation of the effects of initially light and gradually increasing force on orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 2007 May;77(3):410-6.

67. von Bohl M, Maltha JC, Von Den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM. Focal hyalinization during experimental tooth movement in beagle dogs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004 May;125(5):615-23.

68. Pilon JJ, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC. Magnitude of orthodontic forces and rate of bodily tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1996 Jul;110(1):16-23.

69. van Leeuwen EJ, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Tooth movement with light continuous and discontinuous forces in beagle dogs. *Eur J Oral Sci.* 1999 Dec;107(6):468-74.

70. Wise GE, King GJ. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2008 May;87(5):414-34.

71. Long P, Hu J, Piesco N, Buckley M, Agarwal S. Low magnitude of tensile strain inhibits IL-1beta-dependent induction of pro-inflammatory cytokines and induces synthesis of IL-10 in human periodontal ligament cells in vitro. *J Dent Res.* 2001 May;80(5):1416-20.

72. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 2005 Jul;39(1):75-85.

73. 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.

74. Gao Y, Grassi F, Ryan MR, Terauchi M, Page K, Yang X, et al. IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):122-32.

75. Mermut S, Bengi AO, Akin E, Kurkcu M, Karacay S. Effects of interferon-gamma on bone remodeling during experimental tooth movement. *Angle Orthod.* 2007 Jan;77(1):135-41.

#### **4 CONCLUSÃO**

Pode-se concluir que a IL-10 e o IFN- $\gamma$  estão presentes na fase inicial e de hialinização da movimentação ortodôntica, com níveis de expressão semelhantes em áreas com grande estímulo de pressão e tensão, como também em áreas intermediárias.

Observou-se, dessa forma, o possível papel do IFN- $\gamma$  em desencadear uma ação fagocitária, como também um estímulo para outras citocinas desencadear o processo de reabsorção óssea; enquanto que a IL-10 manteve o controle do nível da reabsorção óssea e movimentação dentária.

## REFERÊNCIAS

1. Saddi KR, Alves GD, Paulino TP, Ciancaglini P, Alves JB. Epidermal growth factor in liposomes may enhance osteoclast recruitment during tooth movement in rats. *Angle Orthod*. 2008 Jul;78(4):604-9.
2. Koyama Y, Mitsui N, Suzuki N, Yanagisawa M, Sanuki R, Isokawa K, et al. Effect of compressive force on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in osteoblastic Saos-2 cells. *Arch Oral Biol*. 2008 May;53(5):488-96.
3. 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.
4. Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod*. 2006 Jun;28(3):221-40.
5. Tanaka Y, Nakayamada S, Okada Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005 Jun;4(3):325-8.
6. Cattaneo PM, Dalstra M, Melsen B. The finite element method: a tool to study orthodontic tooth movement. *J Dent Res*. 2005 May;84(5):428-33.
7. Oltramari PV, de Lima Navarro R, Henriques JF, Taga R, Cestari TM, Ceolin DS, et al. Orthodontic movement in bone defects filled with xenogenic graft: an experimental study in minipigs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2007 Mar;131(3):302 e10-7.
8. Baba S, Kuroda N, Arai C, Nakamura Y, Sato T. Immunocompetent cells and cytokine expression in the rat periodontal ligament at the initial stage of orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol*. 2011 May;56(5):466-73.
9. Pinkerton MN, Wescott DC, Gaffey BJ, Beggs KT, Milne TJ, Meikle MC. Cultured human periodontal ligament cells constitutively express multiple osteotropic cytokines and growth factors, several of which are responsive to mechanical deformation. *J Periodontal Res*. 2008 Jun;43(3):343-51.
10. Masella RS, Meister M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006 Apr;129(4):458-68.
11. Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J et al. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:33-63.
12. 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.
13. Sarko J. Bone and mineral metabolism. *Emerg Med Clin North Am*. 2005 Aug;23(3):703-21, viii.

14. Proff P, Romer P. The molecular mechanism behind bone remodelling: a review. *Clin Oral Investig*. 2009 Dec;13(4):355-62.
15. Boskey AL, Coleman R. Aging and bone. *J Dent Res*. 2010 Dec;89(12):1333-48.
16. Augat P, Schorlemmer S. The role of cortical bone and its microstructure in bone strength. *Age Ageing*. 2006 Sep;35 Suppl 2:ii27-ii31.
17. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis*. 2002 May;8(3):147-59.
18. Neumann E, Schett G. [Bone metabolism: molecular mechanisms]. *Z Rheumatol*. 2007 Jul;66(4):286-9.
19. Alliston T, Derynck R. Medicine: interfering with bone remodelling. *Nature*. 2002 Apr 18;416(6882):686-7.
20. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*. 2007 Apr;7(4):292-304.
21. LeBlanc AD, Spector ER, Evans HJ, Sibonga JD. Skeletal responses to space flight and the bed rest analog: a review. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2007 Jan-Mar;7(1):33-47.
22. McCord JF, Blum I. Prevention of bone loss for edentulous patients. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 2003 Jun;11(2):71-4.
23. Franchi L, Baccetti T. Forces released during alignment with a preadjusted appliance with different types of elastomeric ligatures. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006 May;129(5):687-90.
24. Fuck LM, Drescher D. Force systems in the initial phase of orthodontic treatment -- a comparison of different leveling arch wires. *J Orofac Orthop*. 2006 Jan;67(1):6-18.
25. Proffit WR. *Biologic basis of orthodontic therapy*. 3rd ed. Proffit WR FH, editor. St Louis, Calif.: Mosby - Year Book Inc; 2000.
26. Iwasaki LR, Chandler JR, Marx DB, Pandey JP, Nickel JC. IL-1 gene polymorphisms, secretion in gingival crevicular fluid, and speed of human orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res*. 2009 May;12(2):129-40.
27. 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.
28. Luppapornlarp S, Kajii TS, Surarit R, Iida J. Interleukin-1beta levels, pain intensity, and tooth movement using two different magnitudes of continuous orthodontic force. *Eur J Orthod*. 2010 Oct;32(5):596-601.
29. Owman-Moll P, Kurol J, Lundgren D. Continuous versus interrupted continuous orthodontic force related to early tooth movement and root resorption. *Angle Orthod*.

1995;65(6):395-401; discussion -2.

30. Owman-Moll P, Kurol J, Lundgren D. Effects of a doubled orthodontic force magnitude on tooth movement and root resorptions. An inter-individual study in adolescents. *Eur J Orthod.* 1996 Apr;18(2):141-50.

31. Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Optimum force magnitude for orthodontic tooth movement: a systematic literature review. *Angle Orthod.* 2003 Feb;73(1):86-92.

32. Yee JA, Turk T, Elekdag-Turk S, Cheng LL, Darendeliler MA. Rate of tooth movement under heavy and light continuous orthodontic forces. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009 Aug;136(2):150 e1-9; discussion -1.

33. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Garlet TP, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microbes Infect.* 2008 Apr;10(5):489-96.

34. Krishnan V, Davidovitch Z. On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2009 Jul;88(7):597-608.

35. Garlet TP, Coelho U, Repeke CE, Silva JS, Cunha Fde Q, Garlet GP. Differential expression of osteoblast and osteoclast chemmoattractants in compression and tension sides during orthodontic movement. *Cytokine.* 2008 Jun;42(3):330-5.

36. Florez-Moreno GA, Marin-Restrepo LM, Isaza-Guzman DM, Tobon-Arroyave SI. Screening for salivary levels of deoxyypyridinoline and bone-specific alkaline phosphatase during orthodontic tooth movement: a pilot study. *Eur J Orthod.* 2012 Jan 12.

37. Pilon JJ, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC. Magnitude of orthodontic forces and rate of bodily tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1996 Jul;110(1):16-23.

38. Tomizuka R, Shimizu Y, Kanetaka H, Suzuki A, Urayama S, Kikuchi M, et al. Histological evaluation of the effects of initially light and gradually increasing force on orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 2007 May;77(3):410-6.

39. van Leeuwen EJ, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Tooth movement with light continuous and discontinuous forces in beagle dogs. *Eur J Oral Sci.* 1999 Dec;107(6):468-74.

40. Wise GE, King GJ. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2008 May;87(5):414-34.

41. 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.

42. 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 Jul;130(1):7 e1-6.

43. Ren Y, Vissink A. Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. *Eur J Oral Sci.* 2008 Apr;116(2):89-97.
44. Galli C, Passeri G, Macaluso GM. Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation. *J Dent Res.* 2010 Apr;89(4):331-43.
45. Henneman S, Von den Hoff JW, Maltha JC. Mechanobiology of tooth movement. *Eur J Orthod.* 2008 Jun;30(3):299-306.
46. You L, Temiyasathit S, Lee P, Kim CH, Tummala P, Yao W, et al. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone.* 2008 Jan;42(1):172-9.
47. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med.* 2006 Jan;12(1):17-25.
48. Harvey HA, Cream LR. Biology of bone metastases: causes and consequences. *Clin Breast Cancer.* 2007 Jul;7 Suppl 1:S7-S13.
49. Bartold PM, Marshall RI, Haynes DR. Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review. *J Periodontol.* 2005 Nov;76(11 Suppl):2066-74.
50. Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Martins W, Jr., Silva JS. Expression of suppressors of cytokine signaling in diseased periodontal tissues: a stop signal for disease progression? *J Periodontal Res.* 2006 Dec;41(6):580-4.
51. Romas E. Bone loss in inflammatory arthritis: mechanisms and therapeutic approaches with bisphosphonates. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2005;19(6):1065-79.
52. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone.* 2007 Feb;40(2):251-64.
53. Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Redini F, Heymann D. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Sep;64(18):2334-50.
54. Tan L, Ren Y, Wang J, Jiang L, Cheng H, Sandham A, et al. Osteoprotegerin and ligand of receptor activator of nuclear factor kappaB expression in ovariectomized rats during tooth movement. *Angle Orthod.* 2009 Mar;79(2):292-8.
55. Nakano Y, Yamaguchi M, Fujita S, Asano M, Saito K, Kasai K. Expressions of RANKL/RANK and M-CSF/c-fms in root resorption lacunae in rat molar by heavy orthodontic force. *Eur J Orthod.* 2011 Aug;33(4):335-43.
56. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell.* 2000 Jan 21;100(2):197-207.
57. Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ, Myers DE, Hodge JM, Malakellis M, et al. Leptin inhibits osteoclast generation. *J Bone Miner Res.* 2002 Feb;17(2):200-9.



58. Luo XH, Guo LJ, Xie H, Yuan LQ, Wu XP, Zhou HD, et al. Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J Bone Miner Res.* 2006 Oct;21(10):1648-56.
59. Reid IR. Relationships between fat and bone. *Osteoporos Int.* 2008 May;19(5):595-606.
60. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2003 Mar;74(3):391-401.
61. Nakamura I, Jimi E. Regulation of osteoclast differentiation and function by interleukin-1. *Vitam Horm.* 2006;74:357-70.
62. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(4):498-521.
63. Williams RO. Pathogenesis and therapy of rheumatoid arthritis. *Ernst Schering Found Symp Proc.* 2006(1):107-30.
64. Su DL, Lu ZM, Shen MN, Li X, Sun LY. Roles of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of SLE. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:347141.
65. Jansen RG, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. Interferon-gamma-loaded collagen scaffolds reduce myofibroblast numbers in rat palatal mucosa. *Eur J Orthod.* 2011 Feb;33(1):1-8.
66. Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol.* 2006 Feb;21(1):12-20.
67. Garlet GP, Martins W, Jr., Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2003 Apr;38(2):210-7.
68. Baker PJ, Dixon M, Evans RT, Dufour L, Johnson E, Roopenian DC. CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infect Immun.* 1999 Jun;67(6):2804-9.
69. Kamolmatyakul S, Chen W, Li YP. Interferon-gamma down-regulates gene expression of cathepsin K in osteoclasts and inhibits osteoclast formation. *J Dent Res.* 2001 Jan;80(1):351-5.
70. Gao Y, Grassi F, Ryan MR, Terauchi M, Page K, Yang X, et al. IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):122-32.
71. Mermut S, Bengi AO, Akin E, Kurkcu M, Karacay S. Effects of interferon-gamma on bone remodeling during experimental tooth movement. *Angle Orthod.* 2007 Jan;77(1):135-41.

72. Passoja A, Puijola I, Knuuttila M, Niemela O, Karttunen R, Raunio T, et al. Serum levels of interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2010 Oct;37(10):881-7.
73. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*. 2007 Apr;86(4):306-19.
74. Hu KF, Huang KC, Ho YP, Lin YC, Ho KY, Wu YM, et al. Interleukin-10 (-592 C/A) and interleukin-12B (+16974 A/C) gene polymorphisms and the interleukin-10 ATA haplotype are associated with periodontitis in a Taiwanese population. *J Periodontal Res*. 2009 Jun;44(3):378-85.
75. Liu D, Yao S, Wise GE. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. *Eur J Oral Sci*. 2006 Feb;114(1):42-9.
76. Mohamed SG, Sugiyama E, Shinoda K, Taki H, Hounoki H, Abdel-Aziz HO, et al. Interleukin-10 inhibits RANKL-mediated expression of NFATc1 in part via suppression of c-Fos and c-Jun in RAW264.7 cells and mouse bone marrow cells. *Bone*. 2007 Oct;41(4):592-602.
77. Dennis VA, Jefferson A, Singh SR, Ganapamo F, Philipp MT. Interleukin-10 anti-inflammatory response to *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease: a possible role for suppressors of cytokine signaling 1 and 3. *Infect Immun*. 2006 Oct;74(10):5780-9.
78. Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res*. 1999 Jun;19(6):563-73.
79. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005 Jul;39(1):75-85.

## APÊNDICES

## Apêndice 1 - Instrumento de doação de dentes

**Identificação do Doador**

Nome: \_\_\_\_\_

Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Local de Nascimento: \_\_\_\_\_

RG nº: \_\_\_\_\_ CPF n. \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Telefones para contato: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

**DECLARAÇÃO**

Declaro ter sido esclarecido(a) que necessidades ortodônticas levaram à remoção do(s) dentes..... (códigos) e concordo que os mesmos sejam utilizados na pesquisa “Expressão de IFN- $\gamma$  e de IL-10 no ligamento periodontal durante o movimento dentário ortodôntico”.

Ainda, fui esclarecido (a) pelo pesquisador que minha identidade não será divulgada por qualquer meio e que o material recolhido será utilizado unicamente para a presente pesquisa.

Londrina, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

---

Assinatura do paciente ou responsável

**ANEXOS**

## Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa