



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL



JULIANA APOLINÁRIO DA FONSECA

**QUANTIFICAÇÃO DE MMP-13 EM ÁREAS DE TRAÇÃO E DE
COMPRESSÃO, DURANTE O MOVIMENTO ORTODÔNTICO - ESTUDO
EM CAMUNDONGOS SOB TRATAMENTO COM BISFOSFONATO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da
Universidade de São Paulo

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO NELSON FILHO

RIBEIRÃO PRETO

2024

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Fonseca, Juliana Apolinário

Quantificação de MMP-13 em áreas de tração e de compressão, durante o movimento ortodôntico - Estudo em camundongos sob tratamento com bisfosfonato.
Fonseca, Juliana Apolinário, 2024.

27p.: il.; 30cm

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Nível Graduação.

Orientador: Nelson-Filho, Paulo

1. Metaloproteinase-13; 2. Remodelação Óssea; 3. Movimento Ortodôntico;
4. Biologia Molecular; 5. Imunoensaio.



O referido trabalho foi desenvolvido nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células, do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.
- Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (LMME), do Departamento de Biologia Celular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, os mais sinceros e profundos agradecimentos *a Deus e à minha espiritualidade*, pela minha vida, por terem me concedido a realização do sonho de ingressar na FORP-USP, e por terem me dado energia para ultrapassar todos os obstáculos durante o curso para que, enfim, eu pudesse chegar à conclusão deste ciclo.

À minha família e aos meus amigos, que são o sentido maior da minha existência. Agradeço imensamente pela confiança em mim depositada, pelo encorajamento e pelo apoio nos momentos difíceis. Especialmente *aos meus pais*, por toda a dedicação e, por muitas vezes, abdicarem de seus desejos em prol da minha realização.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, expresso minha admiração e gratidão por sua inestimável disposição em ajudar e transmitir ensinamentos, que me permitiu apresentar este trabalho e obter melhor desempenho no meu processo de formação profissional. Estendo meus agradecimentos *a todos os participantes* que generosamente contribuíram com seu tempo e suas ideias para este estudo.

Por fim, agradeço *à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo*, por fornecer os recursos necessários para encerrar este ciclo de maneira satisfatória.

RESUMO

A aplicação de forças ortodônticas rompe o equilíbrio entre a síntese e a degradação de colágeno no periodonto, promovendo a remodelação óssea e periodontal, com consequente movimentação dentária. A demanda por tratamentos ortodônticos em pacientes adultos que fazem uso de bisfosfonatos tem sido crescente e, por esse motivo, a compreensão das alterações que este tratamento provoca no metabolismo ósseo frente ao movimento ortodôntico é de fundamental importância para uma atuação clínica segura e efetiva.

O objetivo do presente estudo foi quantificar os níveis de MMP-13 em sítios de tração e de compressão, durante a movimentação ortodôntica, em camundongos sob tratamento com bisfosfonato.

Camundongos da linhagem C57BL/6J machos, com 12 semanas, foram submetidos a tratamento com Ácido Zoledrônico (ZOL) e receberam força ortodôntica. A quantificação da MMP-13 foi realizada por meio de ensaio de imunohistoquímica, nas áreas de tração e de compressão, no primeiro molar superior direito, tendo como controle o primeiro molar superior esquerdo, o qual não recebeu força ortodôntica. Os dados foram submetidos à análise estatística por meio dos testes de Wilcoxon, Kruskal-Wallis, t de Student (ANOVA oneway) e correlação de Spearman e Pearson, com nível de significância de 5%.

A força ortodôntica não alterou a expressão de MMP-13 no grupo Solução Salina, para os dois parâmetros mensurados ($p > 0,05$). No entanto, a força ortodôntica alterou a expressão de MMP-13 no grupo Ácido Zoledrônico, para os dois parâmetros mensurados ($p < 0,05$), quando comparou-se os molares submetidos à aplicação de força ortodôntica (movimento) com os que não receberam (sem movimento).

A expressão do anticorpo MMP-13 foi semelhante no grupo Solução Salina nos sítios de compressão e de tração, quando comparou-se os molares submetidos ou não à aplicação de forças ortodônticas ($p > 0,05$). A expressão do anticorpo MMP-13 no ligamento periodontal, no grupo Ácido Zoledrônico, foi menor, tanto nos sítios de tração quanto nos sítios de compressão nos dentes que receberam força ortodôntica ($p < 0,05$).

Verificou-se uma correlação positiva no grupo Solução Salina entre a porcentagem total células/células positivas ($p = 0,00001$) e o deslocamento dentário ($p < 0,0001$). Entretanto, o Ácido Zoledrônico reduziu a expressão de MMP-13 e apresentou efeito negativo no deslocamento dentário, uma vez que observou-se uma correlação negativa ($r = -0,62$) entre o deslocamento dentário e a contagem de Células Positivas/mm² para MMP-13 ($p = 0,030$), nesse grupo.

Os resultados obtidos permitiram concluir que o Ácido Zoledrônico modulou a expressão de MMP-13 no ligamento periodontal, reduzindo sua produção e impactando negativamente a movimentação dentária durante o tratamento ortodôntico.

Palavras-Chave: Metaloproteinase-13; remodelação óssea; movimento ortodôntico; biologia molecular; imunoenensaio.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. PROPOSIÇÃO	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
4. RESULTADOS	14
5. DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	24
ANEXO A	27

1. INTRODUÇÃO

Quando forças ortodônticas são aplicadas, verifica-se a ocorrência de danos estruturais e alterações bioquímicas no espaço do ligamento periodontal (PDL), com consequente remodelação dos tecidos circundantes (Chang et al., 2023; Kuruthukulam et al., 2023).

Essas forças inicialmente alteram o equilíbrio que existe entre a síntese e a degradação de colágeno no periodonto, além de causarem remodelação constante e dinâmica no tecido ósseo, com envolvimento das Metaloproteinases da Matriz (MMPs) nesse processo. Essas enzimas são expressas em células e estruturas formadoras de tecido ósseo, sendo sua atividade essencial para o desenvolvimento normal dessas estruturas (Kulesza et al., 2023). Estudos recentes estabeleceram que algumas MMPs são enzimas-chave na degradação da matriz colágena. A maioria destas enzimas são sintetizadas e liberadas no PDL em sua forma latente, necessitando então da clivagem para desempenharem sua atividade enzimática (Hathaway-Schrader et al., 2021; Chang et al., 2021; Li et al., 2021).

As MMPs, que estão inseridas na classe de endopeptidases dependentes de zinco e ligadas à remodelação da matriz extracelular (MEC), são macromoléculas essenciais para diversos processos fisiológicos, como reparação, morfogênese, desenvolvimento e homeostase tecidual. Além disso, as MMPs, cuja atividade é modulada e regulada por inibidores teciduais (TIMPs), estão associadas à disponibilidade de fatores de crescimento e participam extensivamente na sinalização celular, para regular processos cruciais como proliferação, migração e apoptose (Baidya et al., 2024).

Tendo em vista que o colágeno tipo I é o maior componente da matriz extracelular do osso e do ligamento periodontal, a literatura tem focado no estudo do papel das collagenases, especialmente a MMP-8 e a MMP-13 (Luchian et al., 2022).

A MMP-13 (Metaloproteinase da Matriz 13) é uma enzima pertencente à família das metaloproteinases da matriz e, assim como a MMP-8, está envolvida na degradação do colágeno, um componente importante da matriz extracelular (Luchian et al., 2022).

No contexto da Ortodontia, as MMPs parecem modular os mecanismos biológicos desencadeados no periodonto, após aplicação de forças mecânicas (Capelli et al., 2011), desempenhando um papel central na remodelação do PDL, durante a movimentação ortodôntica (Leonardi et al., 2007). A MMP-13 também desempenha um papel relevante (Luchian et al., 2022; Choi et al., 2017), em função do processo inflamatório gerado pela aplicação da força e da remodelação que ocorre durante o movimento dentário, envolvendo a degradação e a síntese de componentes da matriz extracelular, incluindo o colágeno.

Verifica-se que os níveis de mRNA de MMP-13 são elevados tanto no lado de tração quanto no lado de compressão em roedores e parecem ser dependentes do tempo pós-aplicação de força ortodôntica (Takahashi et al., 2003). A maioria dos estudos demonstrou uma regulação positiva de MMP-13 apenas no nível transcricional. Entretanto, a literatura descreve que a regulação da atividade de MMP-13 também ocorre mais tarde, em outros níveis (Nagase e Woessner, 1999; Arai et al., 2023). Em 2007, Leonard demonstrou que a MMP-13 está presente tanto no PDL quanto em células ósseas alveolares, após a aplicação de força ortodôntica, participando do processo de remodelação do ligamento periodontal e osso alveolar durante o movimento dentário, 12 a 24 horas após a ativação do aparelho. A magnitude da força parece modular a sua expressão (Li et al., 2010; 2021).

A MMP-13 participa tanto da reabsorção quanto da formação de matriz óssea durante a fase de reparo, e seu papel no processo de reparo ósseo e na reversão para aposição óssea também tem sido alvo de estudos (Henle et al., 2005; Lee et al., 2022). Sabe-se que a sobre-expressão de MMP-13, na movimentação ortodôntica, modula tanto a remodelação óssea quanto a reparação (Choi et al., 2017).

Paralelamente, tem-se verificado uma procura crescente de pacientes adultos fazendo uso de terapias com bisfosfonato para a realização de tratamento ortodônticos (Melsen et al. 2016; Benkimoun et al. 2022). Os bisfosfonatos são tradicionalmente usados na terapia de doenças ósseas metabólicas (Kovacs et al., 2021; Vammi et al., 2021; Xu et al., 2023) e alguns estudos relatam que o Ácido Zoledrônico (ZOL) aumenta a expressão de metaloproteinases da matriz (Arun et al., 2016; Vegger et al., 2018; Basso et al., 2021; Cardoso et al., 2023). O maior conhecimento dos fenômenos de modulação da MMP-13 ocorridos no lado da tração e de compressão pode, futuramente, conduzir ao desenvolvimento de terapêuticas para sua inibição ou estimulação, como possível estratégia para reduzir a reabsorção radicular e favorecer a remodelação óssea, durante o tratamento ortodôntico.

2. PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi quantificar os níveis de MMP-13 em molares superiores submetidos ou não a força ortodôntica, nos sítios de tração e de compressão, em camundongos sob tratamento com Ácido Zoledrônico (ZOL).

Objetivos Específicos

- Avaliar a influência do uso do ZOL na modulação da expressão da MMP-13 em molares de camundongos submetidos ou não à aplicação de forças ortodônticas.
- Quantificar a expressão da MMP-13, em molares de camundongos submetidos ou não à aplicação de forças ortodônticas, nas áreas de tração e de compressão, por meio de técnica de imunohistoquímica.
- Avaliar a correlação entre a movimentação dentária, em milímetros, e a quantificação da expressão de MMP-13, em molares de camundongos submetidos ou não à aplicação de forças ortodônticas.

Hipóteses a serem testadas

- HN_1 : Os níveis de MMP-13 serão iguais nos dois grupos avaliados (camundongos com e sem uso do ZOL).
- HN_2 : A expressão de MMP-13 modula a quantidade de deslocamento dentário igualmente, nos dois grupos avaliados (camundongos com e sem uso do ZOL).

3. MATERIAL E MÉTODOS

No presente projeto, para a realização da técnica de imunohistoquímica foram utilizadas lâminas oriundas do Projeto 2018.1.567.58.1, aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, já concluído. Resumidamente, os procedimentos *já efetuados* (administração da medicação, adaptação e colagem da mola e obtenção das lâminas), e os procedimentos *que foram realizados pela Acadêmica Juliana Apolinário da Fonseca* encontram-se descritos a seguir.

3.1 OBTENÇÃO DAS LÂMINAS

As lâminas utilizadas foram provenientes de 10 camundongos (machos) geneticamente modificados (C57BL/6J- CEMIB) com baixa densidade mineral óssea (Akhter et al., 2000; Armbrecht et al., 2002; Ferguson et al., 2003), divididos aleatoriamente em 2 grupos:

- Grupo I (Controle): 5 animais com 12 semanas que receberam solução salina, intraperitoneal. Após uma semana da administração da solução salina foi implementada força ortodôntica.
- Grupo II (Experimental): 5 animais com 12 semanas receberam medicação (Ácido Zoledrônico) intraperitoneal. Decorrido o período de uma semana da administração da medicação foi implementada força ortodôntica.

Administração da medicação

Uma única dose (45µg/Kg) de Ácido Zoledrônico (Zometa® 4 mg/100 mL, Novartis Biociências S.A., São Paulo - SP) foi administrada por meio de injeção intraperitoneal, no quadrante abdominal inferior direito. A dose adotada se baseou no estudo de Lloyd et al. (2008), onde os autores demonstraram que este é um regime antirreabsortivo eficaz e que a qualidade óssea pode ser preservada com terapia antirreabsortiva de baixa dosagem.

Adaptação e colagem da mola

Foi realizada a colagem de mola fechada de níquel-titânio (Sentalloy Closed Spring Extra Light 25g - Dentsply Sirona®, Charlotte, North Carolina - USA) no primeiro molar superior direito, com o auxílio de microscópio. O lado direito foi adotado como experimental e o

esquerdo como controle.

Os dentes foram limpos com acetona e, na sequência, o primer adesivo Ortodôntico Transbond Plus Self Etching Primer (3M Unitek, Monrovia, Calif, USA) foi aplicado. As molas foram então posicionadas no primeiro molar superior direito e fixadas com adesivo ortodôntico Transbond XT (3M Unitek, Monrovia, Calif, USA) fotopolimerizado por 40 segundos. Com o animal posicionado em mesa fixa a força da mola foi mensurada, sendo estabilizada em 0,35N e fixada, então, na face palatina dos incisivos superiores que serviram como unidade de ancoragem. Assim, o lado de tração foi o lado distal da raiz do primeiro molar superior e o de compressão o lado mesial. O lado direito da maxila (sem aparelho ortodôntico) foi utilizado como controle.

Eutanásia

Foi realizada a eutanásia decorrido o período de 12 dias (Andrade et al., 2009; Taddei et al., 2012; Taddei et al., 2013) (5 animais/grupo), após a aplicação da força ortodôntica, com sobredose anestésica.

Processamento histotécnico

Após a eutanásia, as hemi-mandíbulas direitas e esquerdas foram removidas com tesoura cirúrgica esterilizada e fixadas por imersão em formol tamponado a 10%, por 24 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas por aproximadamente 4 horas, em água corrente. Para a desmineralização das peças, foi utilizada solução à base de EDTA a 4,13% (pH 7-7,4). As peças foram mantidas nesta solução à temperatura ambiente, a qual foi trocada semanalmente, até sua completa desmineralização. Após a desmineralização, as peças foram submetidas ao processamento histotécnico de rotina, sendo lavadas em água corrente por 2 horas, desidratadas em álcool de concentrações crescentes (70% e 95% por 30 minutos cada; 2 trocas de 100% por 20 minutos cada; e 2 trocas de álcool 100% por 40 minutos cada), diafanizadas em xilol (2 banhos de 20 minutos e 1 de 40 minutos) e incluídas em parafina. Os blocos contendo os dentes foram cortados longitudinalmente em micrótomo (Leica RM2145; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) no sentido méso-distal. Cortes semi-seriados de 5µm foram realizados obtendo-se cerca de 15 a 25 lâminas, com 3 cortes em cada lâmina.

3.2 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Cortes centrais, envolvendo a coroa e a raiz foram escolhidos para realização da técnica de imunohistoquímica pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase (Bezerra da Silva et al., 2014; Bertasso et al., 2020), para identificação da MMP-13.

Os cortes foram desparafinizados, imersos em xilol por 8 minutos, sendo o processo repetido por mais duas vezes. Em seguida, os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de álcool (uma imersão em álcool 100%, seguido para o álcool 95% e álcool 80%) e lavados em água corrente.

A recuperação antigênica foi realizada em microondas com tempos de 10 segundos e pausa de 2 minutos, até atingir a temperatura de 82°C, utilizando solução tampão citrato (0,01M-pH6.0). As lâminas foram mantidas à temperatura ambiente para resfriamento, por 1 hora. Em seguida, realizou-se a lavagem por 4 vezes com água destilada. As lâminas foram então depositadas em bandejas apropriadas, sendo realizadas 3 imersões em solução salina tamponada fosfatada (PBS- 10mmol L-1- pH 7,4), por 3 minutos.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com a imersão dos cortes em 100µL de peróxido de hidrogênio a 35% (Merck, Rio de Janeiro, RJ Brasil) por 1 hora, sob abrigo da luz. Em seguida, nova lavagem (3 vezes com PBS) por cinco minutos em imersão. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com imersão em 100µL de solução BSA (Albumina do Soro Humano 1%) e PBS (10mmol L-1- pH 7,4), por 30 minutos.

Foram depositados sobre os cortes 50µL de cada anticorpo primário e as lâminas foram mantidas em geladeira *overnight* em câmara úmida (Tabela 1).

Tabela 1 – Especificação dos anticorpos utilizados

Tipo	Clone/Descrição	Isotipo	Diluição	Marca	Código
Primário MMP-13	Policlonal / Mouse	IgG	1:50	Abclonal	ab39012
Secundário MMP-13	Policlonal /Anti-rabbit	IgG	1:200	Abclonal	-

A seguir, as bandejas contendo as lâminas foram retiradas da geladeira e mantidas na bancada por 1 hora, para estabilização à temperatura ambiente. Foi realizada a lavagem por 3 vezes com PBS (10mmol L-1- pH 7,4) por três minutos, em imersão. Então, foi colocado anticorpo secundário (Tabela 1) biotilado, por 1 hora. Após, 3 lavagens por 5 minutos com 100µL de PBS (10mmol L-1- pH 7,4). As lâminas na sequência, foram submersas em anticorpo terciário (estreptavidina-biotina-peroxidase) por 30 minutos. Novamente foram realizadas 3 lavagens por 3 minutos com 100µL de PBS (10mmol L-1- pH 7,4).

As amostras foram então submetidas à aplicação da diaminobenzidina (DAB) como

cromógeno, por aproximadamente 30 segundos, sendo então enxaguadas abundantemente em água destilada. Após a revelação, as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Carrazzi, durante 30 segundos. Na sequência foram lavadas em água destilada, desidratadas com álcool absoluto, diafanizadas em xilol e montadas em Entellan.

Foi realizado um processo de leitura automatizado das lâminas gerando imagens escaneadas pelo sistema Olympus BX61VS Slide Scanner (Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), por meio do software VS120 Virtual Slide Microscope (Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (LMME) do Departamento de Biologia Celular e Bioagentes Patogênicos, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), utilizando a objetiva com aumento de 20x. Todas as imagens foram geradas no formato svi.

Para a análise digital quantitativa das imagens utilizou-se o software QuPath (<https://qupath.github.io>) (Universidade de Edinburgh, Reino Unido) como descrito por Bankhead et al., 2017; Ormenezi et al., 2022, He et al., 2024). O software utiliza um método de deconvolução de cores dentro do espectro RGB (*red*, *green* e *blue*) (Ruifrok e Johnston, 2001), permitindo a seleção de vetores específicos para identificação de imagens imunohistoquímicas marcadas com hematoxilina e DAB.

As áreas de interesse da análise foram selecionadas manualmente, delimitando o ligamento periodontal na região de interesse: sítios de compressão e de tração. Para isso utilizou-se a ferramenta de desenho disponível "*polygon*". Após a etapa de seleção das áreas de interesse, procedeu-se o processo de detecção de células usando a função "*positive cell detection*". Estabeleceu-se como área mínima $10\mu\text{m}^2$ e máxima de $400\mu\text{m}^2$.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de Skewness e Kurtosi, para verificação de normalidade. O resultado para o parâmetro "% total células/células positivas" demonstrou que os dados não apresentam distribuição normal. Assim, as comparações dos eventos analisados foram feitas pelo teste Wilcoxon/Kruskal-Wallis. Já para o parâmetro "Células Positivas/mm²" os dados apresentaram uma distribuição normal e o teste utilizado foi o Teste t-Student (ANOVA oneway). A análise de correlação entre a imunomarcagem e o deslocamento foi feita pelo teste de correlação de Spearman e Pearson.

O nível de significância adotado para todas as análises foi 5%, utilizando o software SPSS versão 25 e JMP pro versão 17.

4. RESULTADOS

Avaliação da influência do uso do Ácido Zoledrônico na expressão de MMP-13

A análise comparativa entre o grupo tratado com Ácido Zoledrônico (ZOL) e o que recebeu Solução Salina (SS) demonstrou uma menor expressão de MMP-13 ($p < 0,05$) no grupo ZOL, tanto na contagem de Células Positivas/mm² ($p = 0,0023$) quanto na % totais células/células positivas ($p = 0,047$). Esse fato ocorreu tanto nos molares que foram submetidos à força ortodôntica (movimento) quanto nos que não receberam força ortodôntica (sem movimento), demonstrando a influência do medicamento neste marcador, independentemente da aplicação de força ortodôntica (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 – Comparação da % total células/células positivas e de Células Positivas/mm² no ligamento periodontal, nos grupos ZOL e SS, no lado submetido à força ortodôntica

		Movimento		
		AZ (n = 18)	SS (n = 16)	valor p
MMP-13 Raiz mesial	% total células/células positivas	0,70 (0,14 – 1,0)	0,89 (0,37 – 0,99)	0,754
MMP-13 Raiz distal	% total células/células positivas	0,68 (0,12 – 1,0)	0,91 (0,76 – 0,97)	0,047*
		AZ (n = 18)	SS (n = 16)	valor p
MMP-13 Raiz mesial	Células Positivas/mm ²	3842,0 (4061,49)	6351,88 (3298,83)	0,058
MMP-13 Raiz distal	Células Positivas/mm ²	3354,06 (3276,58)	6804,41 (693,37)	0,0023*

Teste de Wilcoxon. Os valores estão apresentados como mediana (Q1 - Q3). Teste t-Student: os valores estão apresentados como média (desvio padrão); * significância estatística.

Tabela 3 - Comparação da % total células/células positivas e de Células Positivas/mm² no ligamento periodontal, ns grupos ZOL e SS, no lado não submetido à força ortodôntica

		Sem Movimento		
		AZ (n = 18)	SS (n = 17)	valor p
MMP-13 Raiz mesial	% total células/células positivas	0,859 (0,67 – 0,94)	0,925 (0,74 – 1,0)	0,360
MMP-13 Raiz distal	% total células/células positivas	1,0 (0,96 – 1,0)	0,933 (0,66 – 1,0)	0,040*
		AZ (n = 6)	SS (n = 18)	valor p
MMP-13 Raiz mesial	Células Positivas/mm ²	6742,17 (1454,67)	5945,53 (1642,90)	0,306
MMP-13 Raiz distal	Células Positivas/mm ²	8597,17 (1325,87)	5816,39 (2610,99)	0,021*

Teste de Wilcoxon. Os valores estão apresentados como mediana (Q1 - Q3). Teste t-Student: os valores estão apresentados como média (desvio padrão); * significância estatística.

Quantificação da expressão de MMP-13 em molares submetidos ou não à força ortodôntica, nos grupos: experimental (ZOL) e controle (SS)

A força ortodôntica não alterou a expressão de MMP-13 no grupo Solução Salina, para os dois parâmetros mensurados ($p > 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Comparação do % total células/células positivas e de Células Positivas/mm², no ligamento periodontal, no grupo SS, entre os lados com e sem movimento

		Solução Salina		
		Movimento (n = 17)	Sem movimento (n = 18)	valor p
MMP-13 Raiz mesial	Células Positivas/mm ²	6351,88 (3298,83)	5945,53 (1642,90)	0,654
MMP-13 Raiz distal	Células Positivas/mm ²	6804,41 (2858,83)	5816,39 (2610,99)	0,293
		Movimento (n = 17)	Sem movimento (n = 18)	valor p
MMP-13 Raiz mesial	% total células/células positivas	0,889 (0,37 – 0,99)	0,925 (0,74 – 1,0)	0,375
MMP-13 Raiz distal	% total células/células positivas	0,910 (0,76 – 0,97)	0,933 (0,66 – 1,0)	0,947

Teste de Wilcoxon. Os valores estão apresentados como mediana (Q1 - Q3). Teste t-Student: os valores estão apresentados como média (desvio padrão); * significância estatística.

A força ortodôntica alterou a expressão de MMP-13 no grupo que recebeu o Ácido Zoledrônico, nos dois parâmetros mensurados ($p < 0,05$), quando comparou-se os molares submetidos à força ortodôntica (movimento) com os que não receberam força ortodôntica (sem movimento) (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação do % total células/células positivas e de Células Positivas/mm², no ligamento periodontal, no grupo ZOL, entre os lados com e sem movimento

		Ácido Zoledrônico		
		Movimento (n = 18)	Sem movimento (n = 6)	valor p
MMP-13 Raiz mesial	Células Positivas/mm ²	3842 (4061,49)	6742,17 (1454,67)	0,104
MMP-13 Raiz distal	Células Positivas/mm ²	3354,06 (3276,58)	8597,17 (1325,87)	0,0011*
		Movimento (n = 18)	Sem movimento (n = 6)	valor p
MMP-13 Raiz mesial	% total células/células positivas	0,702 (0,143 – 1)	0,859 (0,668 – 0,943)	0,591
MMP-13 Raiz distal	% total células/células positivas	0,686 (0,118 – 1,0)	1,0 (0,961 – 1,0)	0,0218**

Teste de Wilcoxon. Os valores estão apresentados como mediana (Q1 - Q3). Teste t-Student: os valores estão apresentados como média (desvio padrão); * significância estatística.

Quantificação da expressão de MMP-13, em molares submetidos ou não à aplicação de forças ortodônticas, nos sítios de tração e de compressão

A expressão de MMP-13 foi semelhante no grupo Solução Salina, nos sítios de compressão e de tração, quando comparou-se os molares submetidos ou não à aplicação de forças ortodônticas ($p > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Comparação do % total células/células positivas e de Células Positivas/mm², no ligamento periodontal nos sítios de tração e compressão, no grupo Solução Salina

		Solução Salina		
Compressão		Movimento (n = 9)	Sem movimento (n = 9)	valor p
MMP-13 Raiz mesial	Células Positivas/mm ²	6428,33 (2983,11)	5597,44 (1942,26)	0,494
MMP-13 Raiz distal	Células Positivas/mm ²	6833,78 (3281,04)	5666,33 (3331,03)	0,465
Tração		Movimento (n = 7)	Sem movimento (n = 8)	valor p
MMP-13 Raiz mesial	Células Positivas/mm ²	6253,57 (3914,14)	6337,13 (1235,76)	0,955
		Movimento (n = 8)	Sem movimento (n = 9)	valor p
MMP-13 Raiz distal	Células Positivas/mm ²	6771,38 (2524,96)	5966,44 (1827,62)	0,4593
Compressão		Movimento (n = 7)	Sem movimento (n = 9)	valor p
MMP-13 Raiz mesial	% total células/células positivas	0,722 (0,38 – 0,98)	0,933 (0,58 – 1,0)	0,288
MMP-13 Raiz distal	% total células/células positivas	0,910 (0,76 – 0,96)	0,956 (0,44 – 1,0)	0,658
Tração		Movimento (n = 7)	Sem movimento (n = 8)	valor p
MMP-13 Raiz mesial	% total células/células positivas	0,962 (0,33 – 0,38)	0,916 (0,77 – 0,98)	1,00
		Movimento (n = 8)	Sem movimento (n = 9)	valor p
MMP-13 Raiz distal	% total células/células positivas	0,939 (0,75 – 1,0)	0,905 (0,70 – 1,0)	0,768

Teste de Wilcoxon. Os valores estão apresentados como mediana (Q1 - Q3). Teste t-Student: os valores estão apresentados como média (desvio padrão); * significância estatística.

Por outro lado, a expressão de MMP-13 no ligamento periodontal, no grupo que recebeu o Ácido Zoledrônico, foi menor tanto nos sítios de tração quanto nos sítios de compressão, na raiz distal dos molares que receberam força ortodôntica ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Comparação do % total células/células positivas e de Células Positivas/mm², no ligamento periodontal nos sítios de tração e compressão, no grupo Ácido Zoledrônico

		Ácido Zoledrônico		
		Movimento (n = 9)	Sem movimento (n = 3)	valor p
Compressão				
MMP-13 Raiz mesial	Células Positivas/mm ²	3793,44 (4597,33)	6588,67 (758,49)	0,334
MMP-13 Raiz distal	Células Positivas/mm ²	3505,11 (3410,56)	8751,67 (2006,10)	0,033*
Tração				
MMP-13 Raiz mesial	Células Positivas/mm ²	3890,56 (3729,96)	6895,67 (2155,03)	0,223
MMP-13 Raiz distal	Células Positivas/mm ²	3203,00(3336,26)	8442,67 (543,31)	0,025*
Compressão				
MMP-13 Raiz mesial	% total células/células positivas	0,655 (0,13 – 1,0)	0,870 (0,59 – 0,93)	0,927
MMP-13 Raiz distal	% total células/células positivas	0,698 (0,10 – 0,96)	1,0 (0,96 – 1,0)	0,0455*
Tração				
MMP-13 Raiz mesial	% total células/células positivas	0,75 (0,12 – 0,99)	0,849 (0,70 – 0,98)	0,517
MMP-13 Raiz distal	% total células/células positivas	0,674 (0,17 – 1,0)	1,0 (0,95 – 1,0)	0,151

Teste de Wilcoxon. Os valores estão apresentados como mediana (Q1 - Q3). Teste t-Student: os valores estão apresentados como média (desvio padrão); * significância estatística.

Correlação entre deslocamento dentário e expressão de MMP-13

Verificou-se uma correlação positiva no grupo Solução Salina entre o porcentual total de células/células positivas e o deslocamento dentário ($p < 0,0001$), indicando que a expressão de MMP-13 favorece o deslocamento dentário, em camundongos não tratados com ZOL (Tabela 8).

Tabela 8- Análise de Correlação entre o deslocamento dentário e a expressão de MMP-13, no Grupo Solução Salina

	Deslocamento		
	Coefficiente de Correlação	valor p	N
% total células/células positivas	$\rho = 0,00001$	$p < 0,0001^*$	12

Correlação Spearman (ρ); * significância estatística.

Entretanto, a modulação do ZOL reduzindo a expressão de MMP-13 também revelou um efeito negativo no deslocamento dentário, uma vez que houve uma correlação negativa ($r = -0,62$) entre o deslocamento dentário e a contagem de Células Positivas/mm² para MMP-13 ($p = 0,030$) (tabela 9).

Tabela 9 - Análise de Correlação entre o deslocamento dentário e a expressão de MMP-13, no Grupo Ácido Zoledrônico

	Deslocamento		
	Coefficiente de Correlação	valor p	N
% Células Positivas/mm ²	r=- 0,62	P=0,030*	12

Correlação Pearson (r); * significância estatística.

As Figuras 1, 2 e 3 ilustram os resultados da imunomarcção para MMP-13.

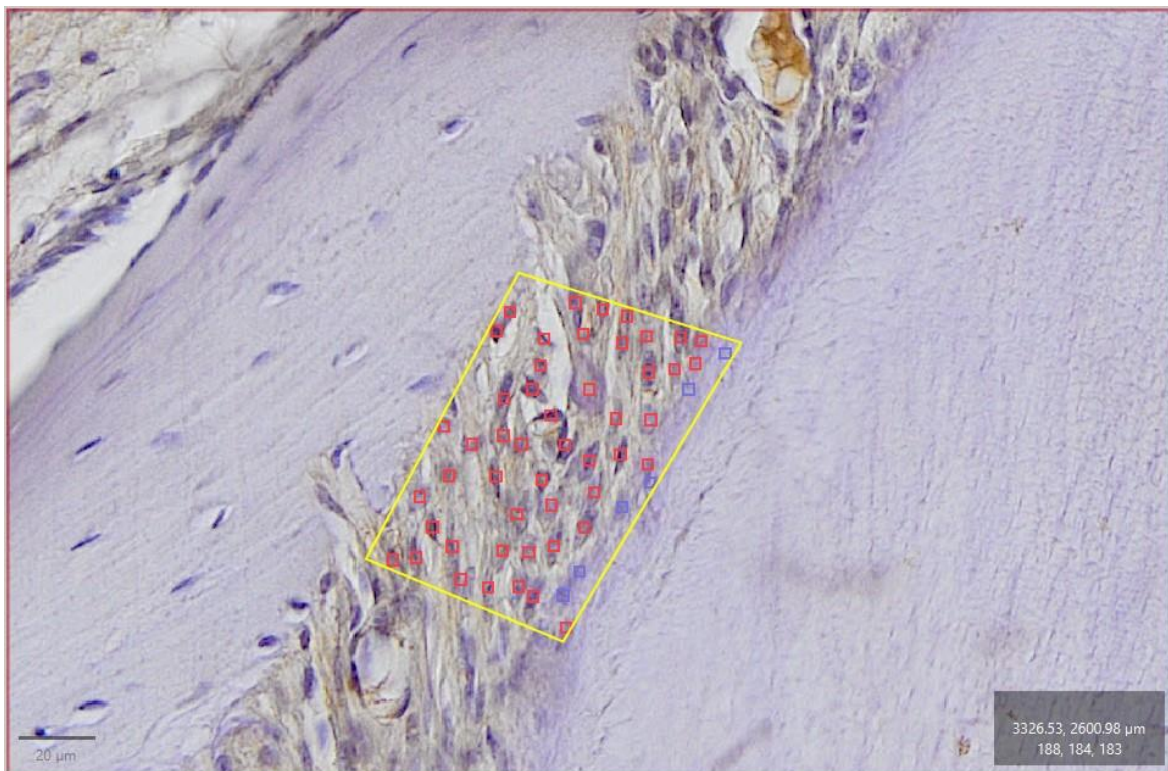


Figura 1. Marcação de células positivas (Cytoplasm DUB OD max) no terço médio da raiz mesial – lado de compressão. Lâmina referente ao grupo tratado com solução salina (SS), sem aplicação de forças ortodônticas. Aumento de 20x.

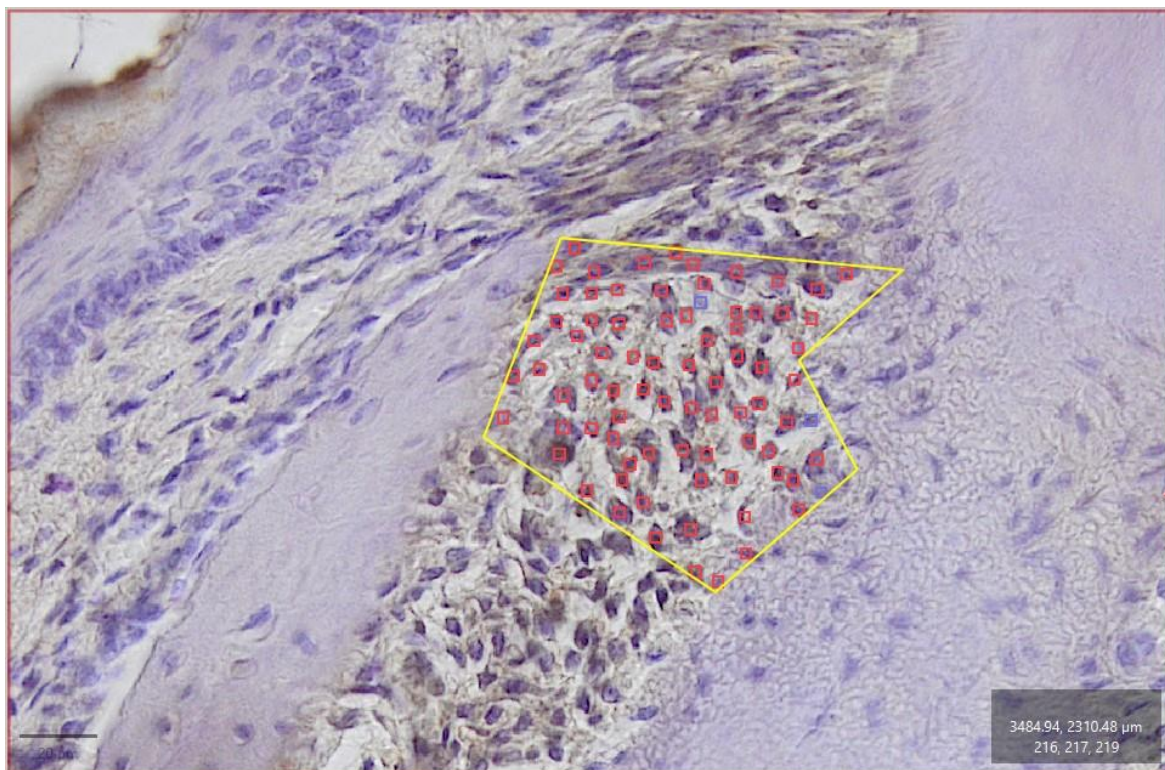


Figura 2. Marcação de células positivas (Cytoplasm DUB OD max) no terço cervical da raiz mesial – lado de compressão. Lâmina referente ao grupo tratado com solução salina (SS), sem aplicação de forças ortodônticas. Aumento de 20x.

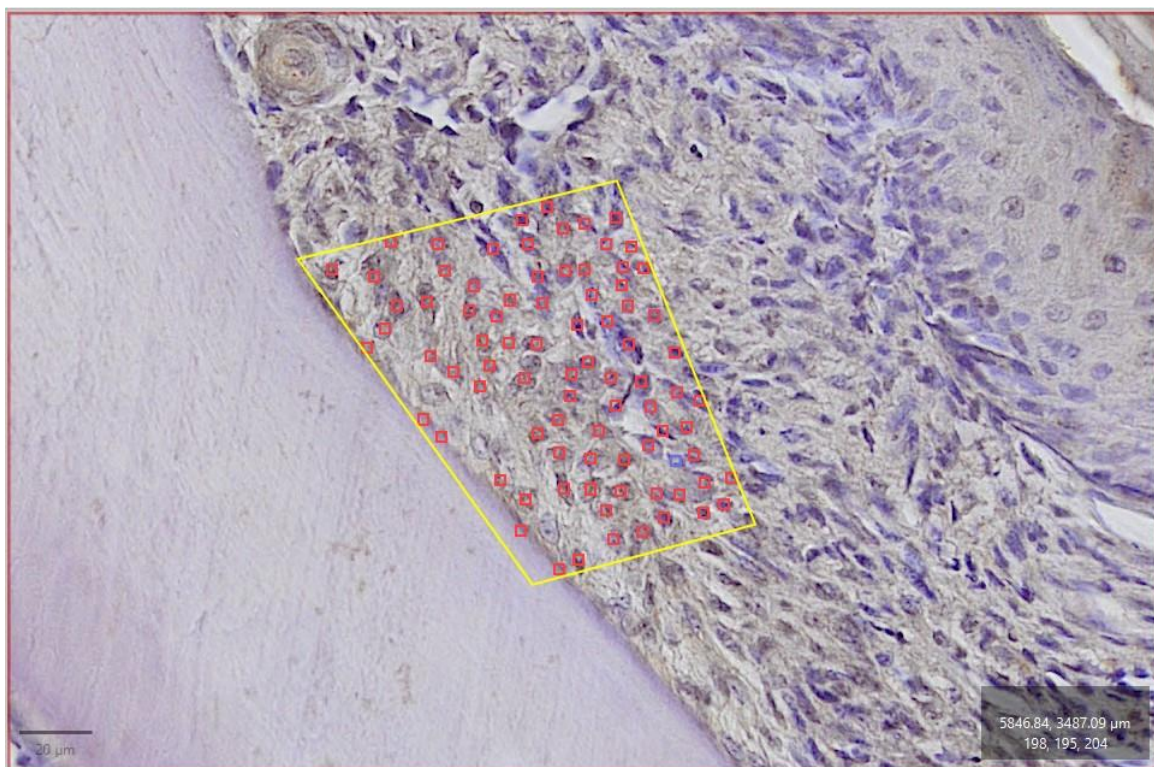


Figura 3. Marcação de células positivas (Cytoplasm DUB OD max) no terço cervical da raiz mesial – lado de compressão. Lâmina referente ao grupo tratado com solução salina (SS), com aplicação de forças ortodônticas e eutanásia. Aumento de 20x.

5. DISCUSSÃO

Durante a movimentação dentária ortodôntica, observa-se a ocorrência de um processo de remodelação equilibrado da matriz extracelular no periodonto adjacente, a fim de permitir a movimentação dentária e a manutenção da integridade funcional do periodonto. Entre os inúmeros mediadores inflamatórios potencialmente envolvidos, as Metaloproteinases da Matriz (MMPs) têm sido implicadas na movimentação dentária ortodôntica (Capelli et al., 2011). O sucesso do tratamento ortodôntico depende, entre outros fatores, da ação coordenada de marcadores bioquímicos, que refletem a atividade enzimática de osteoblastos ou osteoclastos. Alguns medicamentos interferem nesses parâmetros, o que pode comprometer o resultado do tratamento ortodôntico (Gomes et al. 2022). Os bifosfonatos, incluindo o Zoledronato (Ácido Zoledrônico - ZOL), têm como alvo os osteoclastos e são amplamente utilizados no tratamento da osteoporose e outras doenças que ocasionam reabsorção óssea (Arun et al., 2016). Considerando a crescente demanda por tratamentos ortodônticos em pacientes adultos em uso de bisfosfonatos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do uso do ZOL na modulação da expressão de MMP-13, em molares de camundongos submetidos ou não à aplicação de forças ortodônticas, nos sítios de tração e compressão, e sua influência no deslocamento dentário.

Em geral, os resultados do presente estudo evidenciaram que o ZOL modulou a expressão de MMP-13. A resposta à aplicação de força ortodôntica também foi diferente no grupo ZOL, com redução significativa da expressão de MMP-13, nos sítios de tração e de compressão.

A MMP-13 pode ser secretada por osteoblastos, em resposta à sinalização tanto mecânica quanto endócrina. As MMPs degradam matriz osteóide não mineralizada, expondo sítios de adesão de RGD (Tri-peptídeo Arg-Gly-Asp), que promovem tanto a fixação de células-substrato quanto célula-célula, necessária para facilitar a fixação de osteoclastos (Henle et al., 2005; Lee et al., 2022). O aumento da expressão de MMP-13 degrada especialmente colágeno fibrilar tipo I e III (Arun et al., 2016), contribuindo com os processos envolvidos na remodelação tecidual e no deslocamento dentário. Dessa forma, essas afirmativas corroboram com os resultados obtidos no presente estudo, que identificou uma correlação negativa entre o deslocamento dentário e a redução na expressão de MMP-13, observada nos camundongos tratados com ZOL.

Recentemente, elucidou-se que a fase de reversão se inicia pela sobre-expressão da fosfatase alcalina e ausência de marcadores de macrófagos mononucleados (MOMA-2). Macrófagos podem produzir MMPs e osteopontina (Henle et al., 2005; Lee et al., 2022).

Essa sinalização é importante para a fase de reversão entre a reabsorção e a formação óssea (Choi et al., 2017). No presente estudo, evidenciou-se uma sub-expressão de MMP-13 no grupo que recebeu medicação (ZOL), sugerindo acompanhamento por período maior na fase de reparo, uma vez que as análises foram realizadas no período de reparo ósseo de 12 dias, após a aplicação da força. Estudos relatam flutuações estatisticamente significativas durante a movimentação dentária ortodôntica para MMP-13, mas apenas no lado de compressão. Os níveis de MMPs podem aumentar após 1 hora de aplicação de força e diminuir acentuadamente nas 24 horas seguintes (Capelli et al., 2011). O aumento dos níveis na fase inicial da movimentação ortodôntica (Takahashi et al., 2003; Arbelaez et al. 2018; Lin et al., 2021; Lee et al. 2021) ocorre em condições fisiológicas, mas estudos envolvendo o Ácido Zoledrônico relatam uma regulação negativa na expressão do mRNA (Arun et al., 2016; Laghezza et al. 2021). No presente estudo, observamos uma regulação negativa de MMP-13 pelo ZOL, em camundongos, com efeito negativo no movimento dentário, que foi reduzido nesse grupo.

A MMP-13 também desempenha um papel relevante na contenção do processo inflamatório gerado pela aplicação da força, durante o movimento dentário, envolvendo a degradação e a síntese de componentes da matriz extracelular, incluindo o colágeno (Luchian et al., 2022; Choi et al., 2017). No presente estudo, nos animais que receberam solução salina não foi observada alteração na expressão de MMP-13, nem nos sítios de compressão nem nos sítios de tração. Entretanto, no grupo tratado com ZOL, uma redução significativa foi observada nos sítios de compressão, indicando que a sub-expressão de MMP-13 pode impactar não só o deslocamento dentário, como observado nesse estudo, mas também no reparo ósseo, indicando que novos estudos devem ser realizados para avaliar o impacto desse marcador no reparo ósseo, uma vez que os achados do presente trabalho foram realizados na fase de reparo do tecido ósseo.

A literatura, apesar de escassa, têm evidenciado que os níveis de mRNA de MMP-13 são elevados, tanto no lado de tensão quanto no lado de compressão em roedores, e parecem ser dependentes do tempo pós-aplicação de força ortodôntica (Takahashi et al., 2003). A maioria dos estudos demonstrou uma regulação positiva de MMP-13 apenas no nível transcricional. Entretanto, a literatura descreve que a regulação da atividade de MMP-13 também ocorre mais tarde, em outros níveis (Nagase e Woessner, 1999; Arai et al., 2023). Em 2007, Leonard demonstrou que a MMP-13 está presente tanto no PDL quanto em células ósseas alveolares, após a aplicação de força ortodôntica, participando do processo de remodelação do ligamento periodontal e osso alveolar durante o movimento dentário, 12 a 24 horas após a ativação do aparelho. A

magnitude da força parece modular a sua expressão (Li et al., 2010; 2021). No presente estudo, o ZOL modulou negativamente a expressão de MMP-13, no grupo submetido à aplicação de força ortodôntica força ótima e controlada.

As hipóteses levantadas no presente estudo de que os níveis de MMP-13 seriam iguais nos dois grupos avaliados (camundongos com e sem uso do ZOL), e que a expressão de MMP-13 modularia a quantidade de deslocamento dentário igualmente, nos dois grupos avaliados (camundongos com e sem uso do ZOL), não foram aceitas.

Assim, as alterações verificadas no presente trabalho podem ser atribuídas à ação do Ácido Zoledrônico, sugerindo que a movimentação dentária ortodôntica pode ser retardada ou prejudicada, em camundongos, pelo uso de inibidores de MMP-13 (Holliday et al., 2003).

6. CONCLUSÃO

As metodologias empregadas e os resultados obtidos permitiram concluir que o Ácido Zoledrônico modulou a expressão de MMP-13 no ligamento periodontal, reduzindo sua produção e impactando negativamente a movimentação dentária, durante o tratamento ortodôntico.

REFERÊNCIAS

1. Andrade I Jr, Taddei SR, Garlet GP, Garlet TP, Teixeira AL, Silva TA, Teixeira MM. (2009). CCR5 down-regulates osteoclast function in orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 88(11):1037-41.
2. Arai Y, Lee SH. MMP13-Overexpressing Mesenchymal Stem Cells Enhance Bone Tissue Formation in the Presence of Collagen Hydrogel. *Tissue Eng Regen Med.* 2023 Jun;20(3):461-471.
3. Arbelaez ML, Garcia SMV, Lopez JP, Avila D, Munevar JC, Pauwels A. Effect of bisphosphonates on orthodontic tooth movement in osteoporotic patients: A review. *Journal of the World Federation of Orthodontists.* 2018; Volume 7; 49-55.
4. Arun MZ, Reel B, Sala-Newby GB, Bond M, Tsaousi A, Maskell P, Newby AC. Zoledronate upregulates MMP-9 and -13 in rat vascular smooth muscle cells by inducing oxidative stress. *Drug Des Devel Ther.* 2016;18;10:1453-60.
5. Baidya SK, Banerjee S, Ghosh B, Jha T, Adhikari N. A fragment-based exploration of diverse MMP-9 inhibitors through classification-dependent structural assessment. *J Mol Graph Model.* 2024 Jan;126:108671.
6. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, James JA, Salto-Tellez M, Hamilton PW. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep.* 2017 Dec 4;7(1):16878.
7. Basso FG, Cardoso LM, Ribeiro IM, Rizzi E, Pansani TN, Hebling J, de Souza Costa CA. Influence of bisphosphonates on oral implantology: Sodium alendronate and zoledronic acid enhance the synthesis and activity of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts seeded on titanium. *Arch Oral Biol.* 2021 Jul;127:105134.
8. Benkimoun F. Recueillir les signes psychologiques dans le diagnostic des dysmorphoses squelettiques [Collecting psychological signs in the diagnosis of skeletal dysmorphoses]. *Orthod Fr.* 2022;1;93(1):35-39.
9. Bertasso AS, Léon JE, Silva RAB, Silva LAB, de Queiroz AM, Pucinelli CM, Romualdo PC, Nelson-Filho P. Immunophenotypic quantification of M1 and M2 macrophage polarization in radicular cysts of primary and permanent teeth. *Int Endod J.* 2020 May;53(5):627-635.
10. Bezerra da Silva RA, Nelson-Filho P, Lucisano MP, De Rossi A, de Queiroz AM, Bezerra da Silva LA. MyD88 knockout mice develop initial enlarged periapical lesions with increased numbers of neutrophils. *Int Endod J.* 2014 Jul;47(7):675-86.
11. 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.

12. Cardoso LM, Pansani TN, de Souza Costa CA, Basso FG. Naringenin and proanthocyanidins pre-treatment decreases synthesis and activity of gelatinases induced by zoledronic acid in a dental implant surface in vitro model. *Arch Oral Biol.* 2023 Jul;151:105703.
13. Chang AM, Kantrong N, Darveau RP. Maintaining homeostatic control of periodontal epithelial tissue. *Periodontol 2000.* 2021;86(1):188-200.
14. Chang M, Chen Q, Wang B, Zhang Z, Han G. Exosomes from Tension Force-Applied Periodontal Ligament Cells Promote Mesenchymal Stem Cell Recruitment by Altering microRNA Profiles. *Int J Stem Cells.* 2023 May 30;16(2):202-214.
15. Choi EK, Lee JH, Baek SH, Kim SJ. Gene expression profile altered by orthodontic tooth movement during healing of surgical alveolar defect. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2017 Jun;151(6):1107-1115.
16. Gomes RR, Zeola LF, Barbosa TAQ, Fernandes Neto AJ, de Araujo Almeida G, Soares PV. Prevalence of non-carious cervical lesions and orthodontic treatment: a retrospective study. *Prog Orthod.* 2022 May 16;23(1):17.
17. Hathaway-Schrader JD, Novince CM. Maintaining homeostatic control of periodontal bone tissue. *Periodontol 2000.* 2021;86(1):157-187.
18. He M, He B, Weng J, Cheng JQ, Gu H. Manual and Semi-Automated Measurement and Calculation of Osteosarcoma Treatment Effect Using Whole Slide Image and Qupath. *Pediatr Dev Pathol.* 2024 Jan-Feb;27(1):32-38.
19. Henle P, Zimmermann G, Weiss S: Matrix metalloproteinases and failed fracture healing. *Bone* 2005, 37:791-798.
20. Holliday LS, Vakani A, Archer L, Dolce C. Effects of matrix metalloproteinase inhibitors on bone resorption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2003 Sep;82(9):687-91.
21. Kovacs CS, Chaussain C, Osdoby P, Brandi ML, Clarke B, Thakker RV. The role of biomineralization in disorders of skeletal development and tooth formation. *Nat Rev Endocrinol.* 2021;17(6):336-349.
22. Kulesza M, Kicman A, Motyka J, Guszczyn T, Ławicki S. Importance of Metalloproteinase Enzyme Group in selected skeletal system diseases. *Int J Mol Sci.* 2023 Dec 5;24(24):17139.
23. Kuruthukulam RM, Patil AS. The center of resistance of a tooth: a review of the literature. *Biophys Rev.* 2023 Jan 17;15(1):35-41.
24. Lee, K-H, Cheon Lee, S, Jung Kim, H, Kang, Y-G, Kim, S-J. Effect of locally delivered protein complex-loaded nanoparticles on bone remodelling of atrophic alveolar ridge in beagles. *Orthod Craniofac Res.* 2022; 25: 55– 63
25. Leonardi R, Talic NF, Loreto C. MMP-13 (collagenase 3) immunolocalisation during initial orthodontic tooth movement in rats. *Acta Histochem.* 2007;109(3):215-20.
26. Li Y, Tang L, Duan Y, Ding Y. Upregulation of MMP-13 and TIMP-1 expression in response to mechanical strain in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *BMC Res Notes.* 2010 Nov 17;3:309.

27. Li Y, Zhan Q, Bao M, Yi J, Li Y. Biomechanical and biological responses of periodontium in orthodontic tooth movement: up-date in a new decade. *Int J Oral Sci.* 2021;13(1).
28. Lin T, Yang L, Zheng W, Zhang B. Matrix metalloproteinases and Th17 cytokines in the gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Eur J Paediatr Dent.* 2021 Jun;22(2):135-138.
29. Luchian I, Goriuc A, Sandu D, Covasa M. The Role of Matrix Metalloproteinases (MMP-8, MMP-9, MMP-13) in Periodontal and Peri-Implant Pathological Processes. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 4;23(3):1806.
30. Lloyd SA, Travis ND, Lu T, Bateman TA. (2008). Development of a low-dose anti-resorptive drug regimen reveals synergistic suppression of bone formation when coupled with disuse. *J Appl Physiol.* 104(3):729-38.
31. Melsen B. The role of orthodontics in the regeneration of the degenerated dentition. *J Oral Rehabil.* 2016;43(3):226-37.
32. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999 Jul 30;274(31):21491-4.
33. Ormenezi I, Ribeiro-Silva A, Rosa-E-Silva JC, Meola J, Candido-Dos-Reis FJ, Poli-Neto OB. Immunohistochemical expression of Drosha is reduced in eutopic and ectopic endometrium of women with adenomyosis. *Braz J Med Biol Res.* 2022 Dec 12;55:e12375.
34. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol.* 2001 Aug;23(4):291-9. PMID: 11531144.
35. Taddei SR, Andrade I Jr, Queiroz-Junior CM, Garlet TP, Garlet GP, Cunha Fde Q, Teixeira MM, da Silva TA. (2012). Role of CCR2 in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 141(2):153-60.
36. Taddei SR, Moura AP, Andrade I Jr, Garlet GP, Garlet TP, Teixeira MM, da Silva TA. (2012). Experimental model of tooth movement in mice: a standardized protocol for studying bone remodeling under compression and tensile strains. *J Biomech.* 15;45(16):2729-35.
37. Takahashi I, Nishimura M, Onodera K, Bae JW, Mitani H, Okazaki M, Sasano Y, Mitani H. Expression of MMP-8 and MMP-13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. *J Dent Res.* 2003 Aug;82(8):646-51.
38. Vammi S, Bukyya JL, Ck AA, Tejasvi MLA, Pokala A, Hp C, Talwade P, Neela PK, Shyamilee TK, Oshin M, Pantala V. Genetic Disorders of Bone or Osteodystrophies of Jaws-A Review. *Glob Med Genet.* 2021;8(2):41-50.
39. Vegger JB, Brüel A, Thomsen JS. Zoledronic acid prevents disuse osteopenia and augments gene expression of osteoclastic differentiation markers in mice. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2018 Jun 1;18(2):165-175.
40. Xu L, Hu YJ, Peng Y, Wang Z, Wang J, Lu WW, Tang B, Guo XE. Early zoledronate treatment inhibits subchondral bone microstructural changes in skeletally-mature, ACL-transected canine knees. *Bone.* 2023;167:11663

ANEXO A

Anexo A - Certificado de aprovação do Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP-USP), da Universidade de São Paulo (USP). Protocolo nº 2018.1.567.58.1



CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

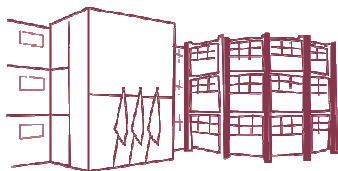
Certificamos que o projeto intitulado “Efeito imediato/tardio do ácido zoledrônico na movimentação ortodôntica, em camundongos osteopóroticos jovens e adultos, empregando marcadores biológicos angiogênicos e do turnover ósseo”, Protocolo nº 2018.1.567.58.1, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Nelson Filho – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 19/09/2018.

Vigência do Projeto	01/10/2018 a 30/09/2019	
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico C57BJ/6	Camundongo isogênico C57BJ/6J
Nº de animais	20	110
Peso/Idade	20-30 g / 6	20-30 g / 6-12
Sexo	Macho	
Origem	CEMIB/UNICAMP	

Ribeirão Preto, 19 de setembro de 2018.


Prof. Dr. Michel Reis Messora

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais



Folha de Informação

Em consonância com a Resolução CoCEx-CoG nº 7.497/2018, informamos que a Comissão de Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) em sua 536ª Reunião Ordinária, realizada em 04 de outubro de 2024, **aprovou**, fundamentando-se na sugestão da Subcomissão para Avaliação dos Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs) da Unidade, **a inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital de Trabalhos Acadêmicos da USP (BDTA).**

Cumpre-nos destacar que a disponibilização deste trabalho na BDTA foi autorizada pelos autores (estudante e docente orientador), conforme menção constante no trabalho e documentação existente no Serviço de Graduação da FORP.

Ribeirão Preto, 04 de novembro de 2024.

Prof. Dr. Michel Reis Messoria
Presidente da Comissão de Graduação
FORP/USP