



**Davidson Fróis Madureira**

**CINÉTICA DA EXPRESSÃO DE IL-6, CCL2 E CCL3  
NOS TECIDOS PERIODONTAIS DURANTE O  
MOVIMENTO DENTÁRIO ORTODÔNTICO**

Faculdade de Odontologia da UFMG

Belo Horizonte

10 de Maio de 2012

Davidson Fróis Madureira

**CINÉTICA DA EXPRESSÃO DE IL-6, CCL2 E CCL3  
NOS TECIDOS PERIODONTAIS DURANTE O  
MOVIMENTO DENTÁRIO ORTODÔNTICO**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre de Mestre em Odontologia - área de concentração: Odontopediatria

Orientadora: Profa. Dra. Tarcília Aparecida da Silva;  
Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia  
Odontológicas – Faculdade de Odontologia/UFMG

Co-Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Maria Bastos  
Lages; Departamento de Odontopediatria e Ortodontia –  
Faculdade de Odontologia/UFMG

Faculdade de Odontologia da UFMG

Belo Horizonte

10 de Maio de 2012

## **Dedicatória**

**A Deus, por proporcionar o suficiente para o meu crescimento... Aos meus pais por incondicionalmente acompanharem minhas pegadas nos caminhos da vida... À minha irmã Dayse e sobrinho Guilherme pelo apoio, carinho e dedicação. À minha amada esposa Aloisiana, pelo amor e compreensão... Vocês são a luz da minha vida!**

## **Agradecimentos**

Agradeço a todos os meus mestres por me ajudarem a trilhar este caminho... Ao prof. Henrique Pretti pela confiança; ao prof. Alexandre Fortes Drummond pela amizade, conselhos e apoio nos momentos difíceis; à prof. Tarcília Aparecida da Silva e Elizabeth Maria Bastos Lages por acreditarem na minha capacidade enquanto aluno de pós-graduação, pelos exemplos e orientações. À professora Dra. Elizabeth Alfenas pelo suporte.

À minha mãe e Flaviane por terem sido minhas auxiliares durante as coletas. A Silvana Taddei por sempre estar disposta a ajudar.

A toda equipe da Odontopediatria e Patologia - professores e alunos – pela convivência, companheirismo, palavras de apoio, discussões produtivas e conselhos.

A toda equipe da Ortodontia - funcionários, professores, alunos e pacientes - pelo apoio durante as coletas.

Ao professor Dr. Wagner Castro pelas considerações na revisão do nosso projeto.

Aos membros da banca examinadora - professores Dr. Dauro Oliveira, Dr. Alexandre Drummond e Dra. Katia Maltos - por aceitarem nosso convite e se dedicarem ao estudo deste trabalho.

A Fapemig, CNPq e Pró-Reitoria de Pós-Graduação pelo apoio financeiro.

À minha família... sem palavras...

Enfim, durante o Mestrado, fase de dedicação, abdições e estudos, seria impossível “chegar aqui” sem apoio de todos vocês e de tantos outros que estão nas entrelinhas... Meu sincero agradecimento! Vocês me fizeram crescer, amadurecer e me tornar um profissional melhor... uma pessoa melhor... Que Deus abençoe todos vocês!

*"Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta."*

*Chico Xavier*

## Resumo

**Introdução:** A aplicação de força ortodôntica induz a remodelação do ligamento periodontal e osso alveolar, a qual é mediada por citocinas e quimiocinas. Este estudo investigou a cinética de expressão de IL-6, CCL2 e CCL3 no ligamento periodontal de dentes humanos submetidos à força ortodôntica. **Métodos:** 64 pré-molares humanos foram utilizados neste estudo tipo boca-dividida. O grupo experimental consistiu de pré-molares submetidos a uma força de 0.980 N em direção apical por períodos de 3 horas, 15 horas, 3 dias, 12 dias e 21 dias, empregando-se um cantiléver de TMA 0.017” x 0.025”. Os dentes contralaterais, sem aparelho ortodôntico, foram utilizados como controle. Os pré-molares foram extraídos por razões ortodônticas e os ligamentos periodontais removidos para análise dos níveis de citocinas por ELISA. **Resultados:** No grupo experimental, observou-se um aumento de CCL2 no 3<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dias, e aumento dos níveis de IL-6 e CCL3 no 12<sup>o</sup> dia, em relação ao grupo controle. **Conclusões:** Nossos resultados demonstram uma expressão diferenciada de IL-6, CCL2 e CCL3 no ligamento periodontal após aplicação de força ortodôntica, o que pode indicar diferentes papéis destas moléculas no processo de remodelação óssea.

## Abstract

**Introduction:** Mechanical loading induces remodeling of periodontal ligament and alveolar bone, which is mediated by cytokines and chemokines. This study investigated the kinetics of IL-6, CCL2 and CCL3 levels in periodontal ligaments subjected to orthodontic forces. **Methods:** 64 human premolars were used in this split-mouth design study. The experimental group consisted of premolars subjected to a 0.980 N apical direction force for 3 hours, 15 hours, 3 days, 12 days or 21 days using a .017” x .025” TMA cantilever. The contralateral teeth, which did not contain orthodontic appliances, were used as controls. The premolars were extracted for orthodontic reasons and the periodontal ligaments were scraped for analysis of cytokine levels by ELISA. **Results:** Compared with the control group, an increase in CCL2 was observed on days 3 and 12, and increases in IL-6 and CCL3 were observed on day 12 in the experimental group. **Conclusions:** Our data demonstrated a differential expression of IL-6, CCL2 and CCL3 in human periodontal ligament after mechanical loading, which may reflect distinct roles of these molecules in the bone remodeling process.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

CCL2: *Monocyte chemotactic protein-1/MCP-1*; Proteína quimiotática de monócitos-1

CCL3: *Macrophage inflammatory protein 1-alpha/MIP-1 $\alpha$* ; Proteína inflamatória de macrófagos 1-alfa

CCR1: *CC chemokine receptor 1*; Receptor de quimiocina CC-1

CCR5: *CC chemokine receptor 5*; Receptor de quimiocina CC-5

GCF: *Gingival Crevicular Fluid*; Fluido crevicular gengival

IL-6: *Interleukin-6*; Interleucina-6

OTM: *Orthodontic tooth movement*; Movimentação dentária ortodôntica

PDL: *Periodontal ligament*; Ligamento periodontal

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais



## Sumário

<b>1. Síntese Bibliográfica.....</b>	<b>10</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>13</b>
<b>3. Material e Métodos e Resultados .....</b>	<b>14</b>
<b>4. Discussão e Considerações finais .....</b>	<b>39</b>
<b>5. Conclusão.....</b>	<b>47</b>
<b>6. Perspectivas .....</b>	<b>48</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>50</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>57</b>
<b>Anexo I – Parecer do Comitê de Ética .....</b>	<b>57</b>
<b>Anexo II – Comprovante de aceitação do artigo à revista AJO-DO. ....</b>	<b>58</b>

## 1 Síntese Bibliográfica

A movimentação dentária ortodôntica (OTM) é o resultado da combinação de uma força aplicada sobre os dentes e o processo de remodelação óssea. O estímulo mecânico gera uma resposta inflamatória asséptica e transitória nos tecidos periodontais. Mediadores de sinalização são então produzidos para desencadear uma resposta biológica associada à remodelação do ligamento periodontal (PDL) e osso alveolar. Há desta forma, reabsorção óssea nas áreas de compressão do PDL e aposição nas áreas de tensão (BUCK; CHURCH, 1972; DAVIDOVITCH *et al.*, 1980; DAVIDOVITCH *et al.*, 1980; DAVIDOVITCH *et al.*, 1988; DAVIDOVITCH *et al.*, 1991; KRISHNAN; DAVIDOVITCH *et al.*, 2006; HENNEMAN *et al.*, 2008; RYGH, 1976; TADDEI *et al.*, 2012; TANNE *et al.*, 1987).

As citocinas são mediadores chave envolvidos no *turnover* fisiológico do osso alveolar e movimento dentário (DAVIDOVITCH *et al.*, 1988; DAVIDOVITCH *et al.*, 1991; MEIKLE, 2006). A citocina interleucina-6 (IL-6) interage diretamente com as células ósseas, regulando localmente o processo de remodelação, particularmente a reabsorção óssea (KRISHNAN; DAVIDOVITCH *et al.*, 2006; OKADA *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2007; MEIKLE, 2006; REN *et al.*, 2007; REN *et al.*, 2008; UEMATSU *et al.*, 1996). A aplicação de força ortodôntica é capaz de aumentar a expressão de IL-6 nos tecidos periodontais humanos (ANASTASI *et al.*, 2008; CAPPELI-JUNIOR *et al.*, 2011; HENNEMAN *et al.*, 2008; MACKIEWICZ *et al.*, 2011; UEMATSU *et al.*, 1996; VAN GASTEL *et al.*, 2011).

As citocinas quimiotáticas (quimiocinas) são importantes sinalizadoras no recrutamento, desenvolvimento, ativação e sobrevivência de células ósseas (CUI;

MADEDDU., 2011; HAN *et al.*, 2001; PROFF *et al.*, 2009) em processos fisiológicos e patológicos (SILVA *et al.*, 2007). Elas podem ser subdividas em quatro categorias principais (CXC, CC, C, CX3C) (BAGGIOLINI, *et al.*, 1997). As quimiocinas também são expressas em tecidos periodontais submetidos à força ortodôntica (ALHASHIMI *et al.*, 1999; ANDRADE *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2009; CAPELLI-JUNIOR *et al.*, 2011; GARTLET *et al.*, 2007; GARLET *et al.*, 2008).

Os estudos que se referem ao padrão de expressão de citocinas e/ou quimiocinas durante a movimentação ortodôntica apresentam heterogeneidade em suas metodologias. Estudos em animais geralmente utilizam amostras de tecidos periodontais (ALHASHIMI *et al.*, 1999; ALHASHIMI *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2009; HAUG *et al.*, 2003). Estudos em humanos utilizam amostras do fluido crevicular gengival (CGF) (BASARAN *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2004; REN *et al.*, 2002 ; REN *et al.*, 2007; REN *et al.*, 2008; UEMATSU *et al.*, 1996; YAO *et al.*, 2003), e tecidos periodontais (GARLET *et al.*, 2007; GARLET *et al.*, 2008; GOTO *et al.*, 2011; KITASE *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2007; OKADA *et al.*, 1997) com tempos e protocolos experimentais distintos. Amostras de PDL têm sido utilizadas para quantificar níveis de mRNA de moléculas sinalizadoras após disjunção palatina (GARLET *et al.*, 2007; GARLET *et al.*, 2008) ou são testadas *in vitro* sob hipóxia (KITASE *et al.*, 2009), estiramento ou compressão de células (LEE *et al.*, 2007; GOTO *et al.*, 2011; DIERCKE *et al.*, 2011) ou sob a influência de citocinas pró-inflamatórias (OKADA *et al.*, 1997; SHIMIZU *et al.*, 1992).

A análise do GCF apresenta a vantagem de ser não invasiva (KRISHNAN *et al.*, 2006; BASARAN *et al.*, 2006; REN *et al.*, 2008; VAN GASTEL *et al.*, 2011), entretanto pode não ser um indicador específico da remodelação periodontal nas áreas de tensão e compressão, pois há uma contínua circulação do GCF no PDL. Sendo assim,

acreditamos que a análise dos tecidos periodontais é mais representativa das alterações neste microambiente. Neste contexto, o estudo do PDL durante a OTM é uma importante ferramenta para esclarecer a resposta celular e molecular à força ortodôntica. Este conhecimento pode ser útil para o tratamento ortodôntico, pois estas moléculas podem ser utilizadas como marcadores de diagnóstico e alvos para intervenção terapêutica (ADAMS; LLOYD; 1997; BARILÉ-NION, BATAILLE, 2003; VAN GASTEL *et al.*, 2011). No nosso conhecimento, não existem estudos disponíveis na literatura que demonstram a cinética de mediadores inflamatórios durante o tratamento ortodôntico em amostras de PDL em desenho experimental tipo boca dividida.

## **2 Objetivo**

O objetivo deste estudo foi determinar a cinética da expressão de IL-6 e das quimiocinas CCL2 e CCL3 no PDL humano durante a movimentação dentária ortodôntica.

### **3 Material e Métodos e Resultados**

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP (Anexo I) .

A apresentação dos tópicos Material e Métodos e Resultados do presente estudo será feita no formato de artigo científico, submetido para publicação ao periódico *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* (Anexo II).

*Kinetics of IL-6, CCL2 and CCL3 expression of the periodontal tissues during  
orthodontic tooth movement*

*Davidson Fróis Madureira<sup>a</sup>*

*Silvana de Albuquerque Taddei<sup>b</sup>*

*Mauro Henrique Nogueira Guimarães Abreu<sup>c</sup>*

*Henrique Pretti<sup>d</sup>*

*Elizabeth Maria Bastos Lages<sup>d</sup>*

*Tarcilia Aparecida da Silva<sup>e1</sup>*

*<sup>a</sup>Postgraduate Student, Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais – Brazil*

*<sup>b</sup>Postgraduate Student, Department of Morphology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais – Brazil*

*<sup>c</sup>Associate Professor, Department of Community and Preventive Dentistry, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil*

*<sup>d</sup>Associate Professor, Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais – Brazil*

*<sup>e</sup>Associate Professor, Department of Oral Surgery and Pathology, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais – Brazil*

---

<sup>1</sup> *Reprint requests to: Tarcília Aparecida da Silva Mailing address: Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Phone: 55 31 3409-2478 (voice); 55 31 3499-2430 (Fax). E-mail: tarcilia@ufmg.br*

***Kinetics of IL-6, CCL2 and CCL3 expression of the periodontal tissues during orthodontic tooth movement***

**ABSTRACT**

**Introduction:** Mechanical loading induces remodeling of periodontal ligament and alveolar bone, which is mediated by cytokines and chemokines. This study investigated the kinetics of IL-6, CCL2 and CCL3 levels in periodontal ligaments subjected to orthodontic forces. **Methods:** 64 human premolars were used in this split-mouth design study. The experimental group consisted of premolars subjected to a 0.980 N apical direction force for 3 hours, 15 hours, 3 days, 12 days or 21 days using a .017" x .025" TMA cantilever. The contralateral teeth, which did not contain orthodontic appliances, were used as controls. The premolars were extracted for orthodontic reasons and the periodontal ligaments were scraped for analysis of cytokine levels by ELISA. **Results:** Compared with the control group, an increase in CCL2 was observed on days 3 and 12, and increases in IL-6 and CCL3 were observed on day 12 in the experimental group. **Conclusions:** Our data demonstrated a differential expression of IL-6, CCL2 and CCL3 in human periodontal ligament after mechanical loading, which may reflect distinct roles of these molecules in the bone remodeling process.

**Key words:** orthodontic tooth movement, bone remodeling, chemokines, cytokines



## **INTRODUCTION**

*Orthodontic tooth movement (OTM) is a combination of force-induced periodontal ligament (PDL) and alveolar bone remodeling.<sup>1-8</sup> Mechanical stimuli exerted on a tooth cause vascular changes that lead to an aseptic and transient inflammatory response in the periodontal tissues. Inflammatory mediators are released and trigger biological processes associated with alveolar bone remodeling such as bone resorption and new bone deposition.<sup>1-14</sup>*

*Cytokines are key mediators involved in bone remodeling under physiological<sup>5,6,15,26</sup> and mechanical loading-induced conditions.<sup>5-7,14,15,17</sup> Interleukin-6 (IL-6) regulates the remodeling process by directly interacting with bone cells.<sup>7,10,11,15,16</sup> Orthodontic forces results in an increase of IL-6 expression in human periodontal tissues.<sup>8,10,16,26-29,31,36</sup> Moreover, chemotactic cytokines (chemokines) are important signals for the trafficking, development, activity and survival of bone cells.<sup>19-21</sup> These molecules are expressed in periodontal tissues subjected to orthodontic forces.<sup>17,21-26</sup>*

*Studies regarding the patterns of cytokine and/or chemokine expression during OTM have shown heterogeneity in their methods. In animal studies, periodontal tissues samples were analyzed under varying conditions.<sup>11,13,14,17,22,25,27</sup> In studies with human subjects, samples from gingival crevicular fluid (GCF)<sup>10,12,28-32</sup> and periodontal tissues<sup>18,23,24,34-36</sup> have been obtained at different time points using distinct experimental protocols. Human PDL samples have been used to quantify mRNA levels of inflammatory molecules after palatal expansion<sup>23,24</sup> or have been tested in vitro under hypoxic treatment,<sup>34</sup> loading of static compressive force,<sup>18</sup> stretching-induced mechanical stress<sup>35,37</sup> or under the influence of pro-inflammatory cytokines.<sup>33,38</sup>*

*Although GCF analysis offered the advantage of being noninvasive,<sup>7,12,30,31</sup> it provides results that represent an indirect measurement of changes in the PDL.<sup>12,29,32</sup> Thus, it may not be a specific indicator of periodontal remodeling in pressure or tension areas.<sup>30</sup> The side-independency of cytokine levels in GCF is probably a result of continuous circulation of the GCF in the PDL.<sup>30</sup> Otherwise, we believe that the use of human PDL is a better representation of the PDL environment. In this setting, PDL evaluation during OTM is an important tool for clarifying the cellular and molecular responses to mechanical loading. This knowledge would be useful for orthodontic treatment because these molecules could be utilized as diagnostic markers and potential targets for therapeutic intervention.<sup>31,39,40</sup> To our knowledge, no study is available that demonstrates the kinetics of inflammatory mediators during OTM using human PDL samples in a split-mouth design. The aim of this study was to determine the kinetics of IL-6 and the CC Chemokine ligand 2 and 3 (CCL2 and CCL3, formerly known as monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein 1-alpha, respectively) expression in human PDL during orthodontic treatment.*

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Experimental subjects***

*Eighteen patients (9 male and 9 female), ages 11-40 years (median 13.5 years  $\pm$  6.96), seen in the Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil, were selected to participate in this study. Based on clinical examinations and orthodontic records, all patients required extraction of the first or second premolars for orthodontic reasons. The inclusion criteria were as follows: (1) healthy patients without any evidence of type 1 or type 2 diabetes mellitus or osteoporosis; (2) patients who had not taken systemic antibiotics, anti-inflammatory or hormonal drugs for 6 months prior to the study; (3) patients who required tooth extractions prior to the treatment with fixed appliances and (4) patients who presented with good periodontal health and no radiographic evidence of periodontal bone loss. This study was approved by the Institutional Ethics Committee (Protocol number: 372/07). Informed consent was obtained from each participant and their guardians when less than 18 years of age.*

### ***Experimental protocol***

*The experimental group consisted of extracted lower and/or upper premolars that had previously received orthodontic mechanical loading. The contralateral teeth from the same arch that did not contain orthodontic appliances were used as controls. In the experimental group, an orthodontic appliance consisting of .022" x .028" Light Roth tubes and brackets (Morelli Orthodontics<sup>®</sup>, Sorocaba, São Paulo, Brazil) was bonded with Transbond<sup>TM</sup> XT (3M Unitek, Monrovia, USA). A .017" x .025" TMA cantilever and .010" metallic ligature (Morelli Orthodontics<sup>®</sup>, Sorocaba, São Paulo, Brazil) were*

*placed between the premolar and first molar on the same side (Figure 1A) by a single orthodontist (DFM). An apical direction force was applied to the premolar. The force magnitude was 0.980 N, measured by a digital Tensiometer (Nidec-Shimpo brand, model FGV-1X, Itasca, Illinois, USA) that was perpendicularly to the cantilever (Figure 1B). No other forces were applied to the teeth prior to or during this phase. The experimental teeth were randomly selected. If a patient had four premolars to be extracted, the pairs of teeth were allocated into two different time points. The patients were instructed and informed to keep proper oral hygiene.*

*The teeth were extracted at the following time points: 3 hours, 15 hours, 3 days, 12 days or 21 days. The PDL of the extracted teeth was taken from the whole root surface. Before the extraction, the force was measured again. PDL of extracted teeth was immediately scraped using a 13/14 Gracey curette (Maximus, Contagem, Minas Gerais, Brazil). The sample was placed into a sterile tube and kept frozen at -80°C for further analysis. Afterwards, the PDL samples were weighed and homogenized in phosphate buffered saline (0.4 mM NaCl and 10 mM NaPO<sub>4</sub>) containing protease inhibitors (0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 0.01 mg/mL aprotinin A) and 0.05% Tween-20 at 1 mg/mL. The mixture was centrifuged (10,000 rpm) for 10 min at 4°C. The supernatant was then collected and assayed with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The concentrations of IL-6, CCL2 and CCL3 were evaluated using commercially available kits according to the manufacturer's instructions (R&D Systems Minneapolis, MN, USA). The results were expressed as picograms of cytokine/100 mg tissue.*

### ***Statistical analysis***

*The Shapiro-Wilk test was used to assess the quantitative variables. There was no normality of cytokines ( $P < 0.05$ ), thus non-parametric tests were used. The Mann-Whitney test was performed to verify the influence of gender on cytokines. The Kruskal-Wallis test was used to compare cytokine levels and type of teeth. The Spearman correlation was used to assess the association between age and cytokines. The Wilcoxon test was used to assess the influence of cytokines on the experiment in each of the time points. The analysis was performed for each time point separately. Thus, although there were more than one pair of tooth per patient, it is possible to consider independence of the sample units. The level of statistical significance was set at  $P < 0.05$ . All statistical evaluations were performed with SPSS (19.0).*

## **RESULTS**

*A total of sixty-four premolars were obtained (34 upper first premolars, 28 lower first premolars and 2 lower second premolars). A mean of 6.4 pair of teeth were allocated at each time point. The demographic description of the participants is described on **Table I**. The appliances were well tolerated. The initially applied force magnitude of 0.980 N was gradually reduced to the median of  $0.892\text{ N} \pm 0.097$  before the extraction of the experimental teeth. Gender, type of tooth, age of the participants and experimental force had no influence on IL-6, CCL-2 or CCL-3 concentrations at any of the time points analyzed ( $P > 0.05$ ).*

*The concentrations of IL-6 and CCL2 and CCL3 are shown in Figure 2. After 3 hours of force application, there were no significant differences between the experimental and control groups for any of the evaluated molecules ( $P > 0.05$ ). Although there was no significant difference at 15 hours, the results showed a tendency towards increase of IL-6 levels ( $P = 0.068$ ). On day 3, the expression of CCL2 was greater in the experimental group than its respective control group ( $P = 0.028$ ). On day 12, IL-6 ( $P = 0.046$ ), CCL2 ( $P = 0.028$ ) and CCL3 ( $P = 0.046$ ) levels were augmented in the experimental group. On day 21, a reduction of these inflammatory mediators was observed; therefore, no difference was detected ( $P > 0.05$ ). In the experimental group, correlations of IL-6 with CCL2 and CCL3 ( $R_s = 0.405$ ,  $P = 0.021$ ;  $R_s = 0.382$ ,  $P = 0.031$ , respectively), and CCL2 with CCL3 ( $R_s = 0.426$ ,  $P = 0.015$ ) were observed.*

## **DISCUSSION**

*Orthodontic tooth movement is achieved through remodeling of the PDL and alveolar bone, triggered by the force-induced biologic response of the periodontium.<sup>1-3,6,7,14,15</sup> Cytokines and chemokines are the key players in PDL response to mechanical loading-induced conditions.<sup>2,3,7,14,15</sup> This is the first paper studying the kinetic of cytokine and chemokines expression in human PDL induced by orthodontic mechanical loading in a split-mouth design. We found different patterns of expression of IL-6, CCL2 and CCL3 at distinct time points after applying an orthodontic force.*

*As observed in experimental studies, mechanical loading with orthodontic appliances results in the production of signaling molecules (e.g. cytokines, chemokines, growth factors and others) in the periodontal tissues<sup>11,17,22-25,27</sup> and in human GCF.<sup>7,10,28-32,41</sup> Of these, the cytokine IL-6 regulates immune responses in inflammation sites<sup>10,33</sup> and has an autocrine/paracrine activity that stimulates osteoclast formation and bone-resorbing activity.<sup>10,16</sup> It plays an important role in local regulation of bone remodeling and in the acute inflammation found at the beginning of orthodontic tooth movement<sup>10,33</sup> IL-6 is detected in human GCF<sup>10,12,28-31</sup> and PDL under orthodontic force.<sup>11,18,33,38</sup> In vitro studies have demonstrated that IL-6 is induced after 12 hours of static compressive force by human PDL cells,<sup>18</sup> and is enhanced by pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ ,<sup>33,38</sup> IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$ .<sup>33</sup> In rats, mechanical loading induced the production of IL-6 on day 3, followed by a decrease on day 7, reaching control levels on day 10.<sup>11</sup> Human studies with GCF demonstrated, in the experimental group, an increase of IL-6 at 24 hours,<sup>10,29</sup> and no significant levels on days 7, 21,<sup>12</sup> months 2, 3,<sup>29</sup> 6<sup>12</sup> or 12.<sup>31</sup> Our results demonstrates an augment of IL-6 after 15 hours and 12 days of force application. On day 21, IL-6 reached control levels. Our data are partially in*

agreement with the literature<sup>10,29</sup>, however, comparison is sometimes difficult because of different experimental protocols used.<sup>11,12,29,31</sup> Taken together, we can consider that IL-6 is produced at the beginning of OTM and its expression decreases over time. A physiological homeostasis is probably reached through down regulation via a feedback mechanism<sup>29</sup> At later stages, other mediators, as chemokines<sup>17,22,24,25</sup> may chief bone remodeling process. Interestingly, IL-6 is able to induce CCL2<sup>22</sup> and enhance the effects of CCL3 on osteoclast formation.<sup>19</sup>

The chemokines CCL2 and CCL3 guide the migration of osteoclasts to bone tissues through interactions with chemokine receptors such as CCR2 or CCR5/CCR1, respectively, expressed on the surfaces of osteoclasts.<sup>13,39,42,43</sup> Furthermore, CCL2 and CCL3 induce osteoclast differentiation, activation and resorbing activity.<sup>20,39,43</sup> In vitro studies with human PDL cells have demonstrated that intermittent stretching-induced mechanical stress up-regulated the expression of CCL2 and CCL3.<sup>35</sup> In mice models, mechanical loading significantly increased levels of chemokines after 12 hours (CCL2<sup>17</sup>), 3 days (CCL2<sup>22,25</sup> and CCL3<sup>25</sup>) and 7 days (CCL2 and CCL3<sup>25</sup>), reaching control levels on day 10.<sup>22</sup> We have not found any reports regarding CCL2 and CCL3 expression in human GCF after orthodontic stimuli. Moreover, after palatal expansion, the compression side of human PDL showed higher expression levels of CCL2 and CCL3.<sup>24</sup> Although we have used light forces and not compared compression versus tension sides, our results also demonstrate that the experimental groups showed elevations in CCL2 (days 3 and 12) and CCL3 (day 12) levels in human PDL. Therefore, mechanical transduction may be responsible for the early release of IL-6 at 15 h, which may be associated to the later induction of CCL2 on day 3. Both molecules may activate and recruit cells from monocyte/macrophage lineage to the pressure side and contribute to osteoclast formation<sup>10,16,20,22,39,43</sup> Indeed, a significant number of



positive preosteoclasts was observed in the PDL and bone surface on day 3.<sup>13</sup> On day 7, histological analysis demonstrated no frontal resorption or tooth movement due to PDL compression and alveolar bone bending.<sup>1</sup> In contrast, on day 14, histological findings have shown widened PDL space with active frontal alveolar bone resorption and tooth movement.<sup>1</sup> These findings may be associated to the induction of IL-6, CCL2 and CCL3 observed by us on day 12. On day 21 a little or no osteoclastic activity was seen either frontal or undermining.<sup>1</sup> This scenario may explain the low levels of IL-6, CCL2 and CCL3 reached on day 21 verified in the present study.

After force application both matrix strain and fluid flow in the PDL and bone cause deformation of cells.<sup>8</sup> Through integrin signaling and other transduction pathways, mediators are produced to activate cells (e.g. fibroblasts, osteoblasts, osteocytes and osteoclasts) involved in bone and PDL remodeling process<sup>8,21,37</sup> during OTM.<sup>8</sup> Direct resorption is associated with light force application (0.490 – 0.890 N), tissue cell preservation and vascular patency. Undermining resorption and hyalinization are associated with heavy or necrotizing forces causing crushing injury to PDL tissues, cell death, hemostasis and cell-free PDL and adjacent alveolar bone zones.<sup>44</sup> Unfortunately, during OTM, some degree of hyalinization appeared to be inevitable,<sup>1,15,45</sup> even with forces as low as 0.294 N.<sup>15</sup> These hyalinized areas can last from 4 to 49 days.<sup>1,7,15,45,46</sup> An inevitable delay of tooth movement occurs due to a delay in induction of cell differentiation within the marrow spaces. In addition, a considerable thickness of bone needs to be removed from the underside before any tooth movement can occur.<sup>1,6-8,46</sup> It results in activation of the cells participating in the resorption of the hyaline zone and alveolar bone, leading to the remodeling of compressed periodontium.<sup>1,6,7,15,22</sup> Osteoclasts must be formed to remove bone from the compressed area of the PDL from adjacent teeth and hyalinized areas, while osteoblasts are needed to form new bone on

*the tension side.<sup>1,7,15,47</sup> Therefore, during the different phases of tooth movement, structural changes in the bone and periodontal tissues occurs, altering local biomechanical environment,<sup>1,47</sup> which leads to modulation of the biological response.<sup>47</sup> This event may explain the different patterns of expression of cytokine and chemokines at different time points seen in this study.*

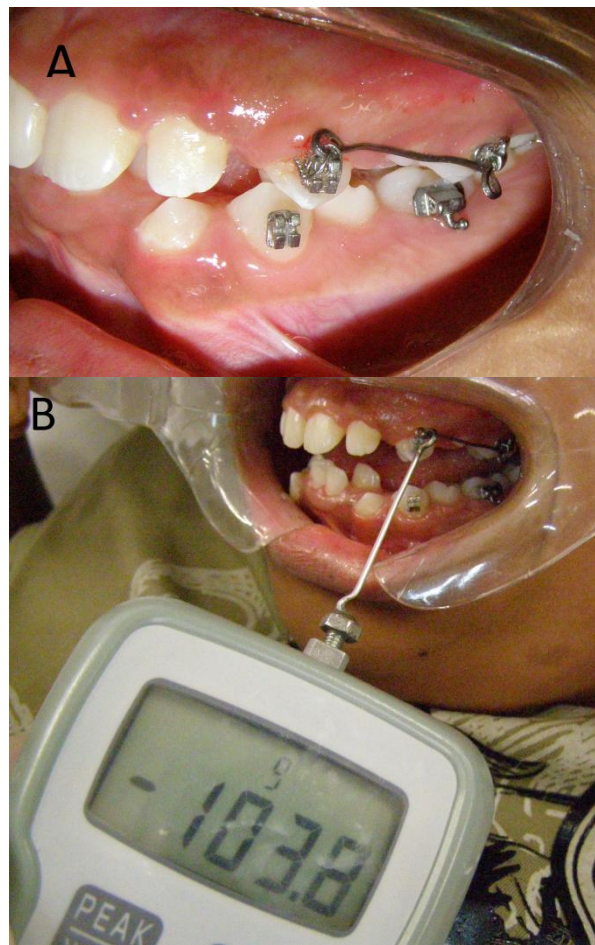
*Finally, human studies concerning OTM have some limitations: (1) histological analysis of human material is limited by the fact that teeth moved with orthodontic appliances have to be extracted, which disrupts the PDL, while the surrounding bone cannot be analysed;<sup>47</sup> (2) Interindividual variation in mechanobiological response is most likely due to differences in bone and PDL cell populations, genomes, and protein expression patterns;<sup>44</sup> (3) There are few studies available (employing different experimental protocols) showing cytokine/chemokines expression in human PDL samples during OTM.<sup>23,24</sup> These difficulties challenge researches to clarify these issues.*

## **CONCLUSIONS**

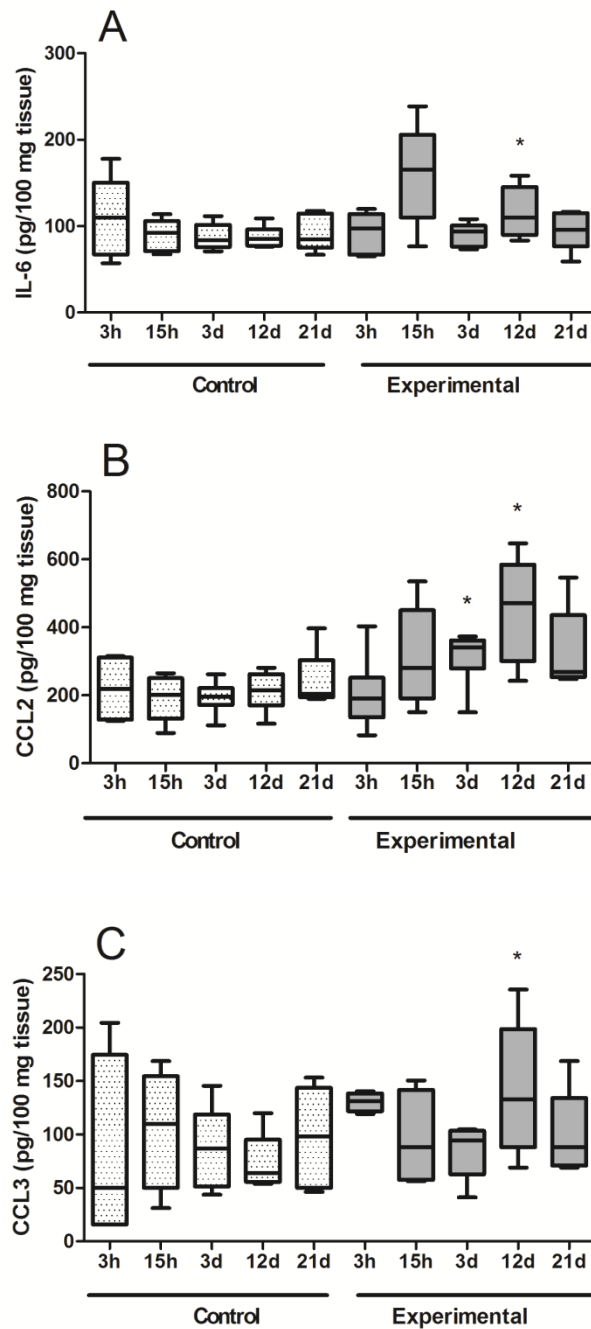
- *This is the first study demonstrating the kinetics of cytokine and chemokine expression during orthodontic tooth movement with human PDL samples in a split-mouth design. Further studies are required to clarify differential cellular and molecular responses to mechanical loading at different time points during orthodontic tooth movement.*
- *This paper showed elevated levels of IL-6, CCL2 and CCL3 at distinct time points after mechanical loading. These findings may indicate distinct roles of these molecules in the bone remodeling process.*

**ACKNOWLEDGMENTS**

*We are grateful to the Fundação de Amparo a Pesquisas do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG for their financial support.*



**Figure 1** – (A) An activated orthodontic appliance consisting of a .022” x .028” bracket and tube (Morelli Orthodontics) was bonded with a Transbond™ XT (3M Unitek, Monrovia, USA) and a .017” x .025” TMA cantilever. (B) The force was set to 0.980 N in the apical direction. The measurement of the force magnitude was performed with a digital tensiometer (Nidec-Shimpo brand, model FGV-1X).



**Figure 2.** Median levels of IL-6 (A), CCL2 (B) and CCL3 (C) in human periodontal ligament after 3 hours, 15 hours, 3 days, 12 days or 21 days of mechanical loading. The experimental teeth were submitted to 0.980 N of mechanical loading while the contralateral teeth were used as controls. PDL samples of 64 teeth were included in this study. The data were expressed as the median  $\pm$  standard deviation. \* $P < 0.05$  comparing the groups at the same time-point by Wilcoxon test.

**Table I** – Demographic distribution of the participants ( $n=18$ ) at the time points and variation of initial and final forces. (Continues)

<i>Time</i>	<i>Patient #</i>	<i>Gender</i>	<i>Age</i>	<i>Control tooth</i>	<i>Experim- mental tooth</i>	<i>Initial force</i>	<i>Final force</i>
<b>3 h</b>	1	F	12	14	24	.980	.980
	2	F	14	14	24	.980	.980
	3	M	23	24	14	.980	.980
	4	F	17	14	14	.980	.980
	5	F	22	14	24	.980	.980
	6	M	14	24	14	.980	.980
	7	F	12	44	34	.980	.980
	<i>n=7</i>		<i>Median</i> <i>14 ±4.57</i>				<i>Median</i> <i>.980 ± 0</i>
<b>15 h</b>	6	M	4	34	44	.980	.921
	7	F	12	24	14	.980	.980
	8	M	16	14	24	.980	.892
	9	M	12	44	34	.980	.976
	10	F	12	34	44	.980	.980
	11	M	17	14	24	.980	.967
	<i>n=6</i>		<i>Median</i> <i>13 ± 2.22</i>				<i>Median</i> <i>.972 ± .037</i>
<b>3 days</b>	3	M	23	34	44	.980	.961
	10	F	12	14	24	.980	.686
	12	F	13	24	14	.980	.960
	13	M	18	34	44	.980	.860
	15	F	40	24	14	.980	.872
	16	M	11	24	14	.980	.787
	<i>n=6</i>		<i>Median</i> <i>15,5 ± 11.04</i>				<i>Median</i> <i>.866 ± .105</i>

<i>Time</i>	<i>Patient #</i>	<i>Gender</i>	<i>Age</i>	<i>Control tooth</i>	<i>Experi- mental tooth</i>	<i>Initial force</i>	<i>Final force</i>
<i>12 days</i>	9	<i>M</i>	12	14	24	.980	.768
	13	<i>M</i>	18	24	14	.980	.885
	14	<i>M</i>	13	14	24	.980	.785
	15	<i>F</i>	40	34	44	.980	.892
	17	<i>F</i>	11	24	14	.980	.902
	18	<i>M</i>	12	34	44	.980	.762
	<i>n=6</i>		<i>Median</i> <i>12.5 ±</i> <i>11.21</i>				<i>Median</i> <i>.835 ±</i> <i>.067</i>
<i>21 days</i>	1	<i>F</i>	12	44	34	.980	.790
	2	<i>F</i>	14	45	35	.980	.690
	4	<i>F</i>	17	44	34	.980	.835
	8	<i>M</i>	16	34	44	.980	.778
	11	<i>M</i>	17	44	34	.980	.760
	12	<i>F</i>	13	44	34	.980	.745
	17	<i>F</i>	11	34	44	.980	.877
	<i>n=6</i>		<i>Median</i> <i>14 ± 2.42</i>				<i>Median</i> <i>.778 ±</i> <i>.061</i>
<i>TOTAL</i>	<i>n=18</i>	<i>M=09</i> <i>F=09</i>	<i>Median</i> <i>13,5 ±</i> <i>6.96</i>				<i>Median</i> <i>892 ±</i> <i>.097</i>



## REFERENCES

1. Buck DL, Church NH. A histologic study of human tooth movement. *Am J Orthod* 1972;62(5):507-16.
2. Davidovitch Z, Finkelson MD, Steigman S, Shanfeld JL, Montgomery PC, Korostoff E. Electric currents, remodeling and orthodontic tooth movement. I. The effect of electric currents on periodontal cyclic nucleotide levels. *Am J Orthod* 1980;77:14-32.
3. Davidovitch Z, Finkelson MD, Steigman S, Shanfeld JL, Montgomery PC, Korostoff E. Electric currents, remodeling and orthodontic tooth movement. II. Increase in rate of tooth movement and periodontal cyclic nucleotide levels by combined force and electric current. *Am J Orthod* 1980;77:33-47.
4. Tanne K, Sakuda M, Burstone CJ. Three-dimensional finite element analysis for stress in the periodontal tissue by orthodontic forces. *Am J Orthod Orthop* 1987; 92:499-505.
5. Davidovitch Z, Nicolay O, Ngan PW, Shanfeld JL. Neurotransmitters, cytokines and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dent Clin North Am* 1988;32:411-35.
6. Davidovitch Z. Tooth movement. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991;2:411-50.
7. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129:e1-32.
8. Henneman S, Von den Hoff JW, Maltha JC. Mechanobiology of tooth movement. *Eur J Orthod* 2008;30(3):299-306.
9. Rygh P. Ultrastructural changes in tension zones of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. *Am J Orthod* 1976;70:269-281.

10. Uematsu S, Mogi M, Deguchi T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 1996;75(1):562-7.
11. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiat M. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;119:307-12.
12. Başaran 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;130(1):7.e1-6.
13. Rody WJ Jr, King GJ, Gu G. Osteoclast recruitment to sites of compression in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;120:477-89.
14. Taddei SR, Andrade I Jr, Queiroz-Junior CM, Garlet TP, Garlet GP, Cunha Fde Q, Teixeira MM, da Silva TA. Role of CCR2 in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012;141(2):153-60.
15. Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod* 2006;28:221–40.
16. Mackiewicz Z, Niklińska WE, Kowalewska J, Chyczewski L. Bone as a source of organism vitality and regeneration. *Folia Histochem Cytobiol* 2011;49(4):558-69.
17. Andrade I Jr, Silva TA, Silva GA, Teixeira AL, Teixeira MM. The role of tumor necrosis factor receptor type 1 in orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 2007;86(11):1089-94.

18. Lee YH, Nahm DS, Jung YK, Choi JY, Kim SG, Cho M, Kim MH, Chae CH, Kim SG. Differential gene expression of periodontal ligament cells after loading of static compressive force. *J Periodontol* 2007;78(3):446-52.
19. Han JH, Choi SJ, Kurihara N, Koide M, Oba Y, Roodman GD. Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  is an osteoclastogenic factor in myeloma that is independent of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand. *Blood* 2001;97(11):3349-53.
20. Cui Y, Madeddu P. The Role of Chemokines, Cytokines and Adhesion Molecules in Stem Cell Trafficking and Homing. *Curr Pharm Des* 2011; 17(30):3271-9.
21. Proff P, Römer P. The molecular mechanism behind bone remodelling: a review. *Clin Oral Investig* 2009;13(4):355-62.
22. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiat M. Chemokines are upregulated during orthodontic tooth movement. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 1999;19:1047–1052.
23. 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;115:355–62.
24. 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.
25. Andrade I Jr, Taddei SRA, Garlet GP, Garlet TP, Teixeira AL, Silva TA, Teixeira MM. CCR5 Down-regulates Osteoclast Function in Orthodontic Tooth Movement. *J Dent Res* 2009;88(11):1037-1041.

26. Capelli Junior J, 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;33(6):705-11.
27. Haug SR, Brudvik P, Fristad I, Heyeraas KJ. *Sympathectomy causes increased root resorption after orthodontic tooth movement in rats: immunohistochemical study. Cell Tissue Res* 2003;313(2):167-75.
28. Yao YL, Feng XP, Jing XZ. *The correlation between tooth pain and bioactivators changes in gingival crevicular fluid after applying orthodontic stress. Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2003;12(5):331-3.
29. 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;78(3):453-8.
30. Ren Y. *Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. Eur J Oral Sci* 2008;116:89-97.
31. van Gastel J, Teughels W, Quirynen M, Struyf S, Van Damme J, Coucke W, Carels C. *Longitudinal changes in gingival crevicular fluid after placement of fixed orthodontic appliances. Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011;139(6):735-44.
32. 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;29(8):757-62.
33. Okada N, Kobayashi M, Mugikura K, Okamatsu Y, Hanazawa S, Kitano S, et al. *Interleukin-6 production in human fibroblasts derived from periodontal tissues is differentially regulated by cytokines and a glucocorticoid. J Periodontol Res* 1997;32:559-69.

34. Kitase Y, Yokozeki M, Fujihara S, Izawa T, Kuroda S, Tanimoto K, Moriyama K, Tanaka E. Analysis of gene expression profiles in human periodontal ligament cells under hypoxia: the protective effect of CC chemokine ligand 2 to oxygen shortage. *Arch Oral Biol* 2009;54(7):618-24.
35. Goto KT, Kajiya H, Nemoto T, Tsutsumi T, Tsuzuki T, Sato H, Okabe K. Hyperocclusion stimulates osteoclastogenesis via CCL2 expression. *J Dent Res* 2011;90(6):793-8.
36. Anastasi G, Cordasco G, Matarese G, Rizzo G, Nucera R, Mazza M, Militi A, Portelli M, Cutroneo G, Favalaro A. An immunohistochemical, histological, and electron-microscopic study of the human periodontal ligament during orthodontic treatment. *Int J Mol Med* 2008;21(5):545-54.
37. Diercke K, Kohl A, Lux CJ, Erber R. Strain-dependent up-regulation of ephrin-B2 protein in periodontal ligament fibroblasts contributes to osteogenesis during tooth movement. *J Biol Chem* 2011;286(43):37651-64.
38. Shimizu N, Ogura N, Yamagushi M, Goseky T, Shibata Y, Abiko Y, Iasawa T, Takiguchi H. Stimulation by interleukin-1 of interleukin-6 production by human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* 1992;37(9):743-8.
39. Barillé-Nion S, Bataille R. New insights in myeloma-induced osteolysis. *Leuk Lymphoma* 2003;44(9):1463-7.
40. Adams DH, Lloyd AR. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* 1997;349:490-5.
41. Lee KJ, Park YC, Yu HS, Choi SH, Yoo YJ. Effects of continuous and interrupted orthodontic force on interleukin-1beta and prostaglandin E2 production in gingival crevicular fluid. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;125(2):168-77.

42. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997;15:675–705.
43. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res* 2007;86:306–19.
44. Masella RS, Meister M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129(4):458-68. Review
45. Kurol J, Owman-Moll P. Hyalinization and root resorption during early orthodontic tooth movement in adolescents. *Angle Orthod* 1998;68(2):161-5.
46. Reitan K. Some factors determining the evaluation of forces in orthodontics. *Am J Orthod* 1957;43:32-51.
47. von Böhl M, Kuijpers-Jagtman AM. Hyalinization during orthodontic tooth movement: a systematic review on tissue reactions. *Eur J Orthod* 2009;31(1):30-6. Review.

## 4 Discussão e Considerações finais

A movimentação dentária ortodôntica é obtida através da remodelação do PDL e osso alveolar, induzida por uma aplicação de força no periodonto. Citocinas e quimiocinas são moléculas chave na resposta do PDL humano a esta força mecânica (DAVIDOVITCH *et al.*, 1980; DAVIDOVITCH *et al.*, 1980; KRISHNAN; DAVIDOVITCH *et al.*, 2006; MEIKLE, 2006). O objetivo do presente trabalho foi esclarecer a cinética da expressão de moléculas sinalizadoras envolvidas no processo de reabsorção óssea (IL-6, CCL2 e CCL3), em amostras de PDL humano, após a aplicação de força ortodôntica leve, durante os diferentes estágios do tratamento ortodôntico (3 horas, 15 horas, 3 dias, 12 dias e 21 dias). Para minimizar os efeitos das variações interindividuais, optamos pela utilização do modelo de estudo tipo boca-dividida, sendo inédito na literatura para este tipo de experimento. Obtivemos diferentes padrões de expressão de IL-6, CCL2 e CCL3, nos diferentes tempos estudados, após a indução da movimentação dentária.

Embora a força ortodôntica ideal - aquela que proporciona maior eficiência no movimento dentário - ainda não pode ser definida devido à heterogeneidade nas metodologias utilizadas na literatura (REN *et al.*, 2003), a magnitude da força empregada neste estudo foi definida em 0.980 N. Uma vez que forças mais elevadas poderiam resultar em uma *lag phase* de aproximadamente 21 dias antes que qualquer movimento dentário ocorresse (VON BOHL; KUIJPERS-JAGTMAN, 2009; REITAN *et al.*, 1957; REN). Outros estudos demonstraram que forças entre 0.588 – 0.686 N são também eficazes para induzir a movimentação ortodôntica (GIANELLY, GOLDMAN, 1971; REITAN *et al.*, 1957). Neste contexto, embora, no presente estudo, a força tenha

sofrido uma redução ( $892 \pm .097$  N), provavelmente devido a danos ocorridos no cantiléver durante a mastigação, esta não foi significativa. Desta forma, este evento não teve influência nos resultados, uma vez que forças maiores que 0.588 N estavam presentes durante todo o experimento.

A literatura tem demonstrado que a aplicação de força ortodôntica, através de aparelhos, resulta na produção de moléculas de sinalização (citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, entre outros) nos tecidos periodontais de animais (ALHASHIMI *et al.*, 1999; ALHASHIMI *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2009; HAUG *et al.*, 2003), assim como no GCF humano (KRISHNAN; DAVIDOVITCH *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2004 ; REN *et al.*, 2007; REN *et al.*, 2008; REN *et al.*, 2002; YAO *et al.*, 2003) e PDL humano (GARLET *et al.*, 2007; GARLET *et al.*, 2008).

Dentre estes mediadores inflamatórios, a citocina IL-6 regula a resposta imunológica nos sítios de inflamação (OKADA *et al.*, 1997; UEMATSU *et al.*, 1996) e tem uma ação autócrina/parácrina que estimula a formação de osteoclastos e a atividade de reabsorção óssea (MACKIEWICZ *et al.*, 2011; UEMATSU *et al.*, 1996). Esta molécula possui um importante papel na regulação da remodelação óssea na inflamação aguda encontrada no início da movimentação dentária (OKADA *et al.*, 1997; UEMATSU *et al.*, 1996). IL-6, induzida por força ortodôntica, é expressa em GCF humano (BASARAN *et al.*, 2006; REN *et al.*, 2007; REN *et al.*, 2008; UEMASTU *et al.*, 1996; VAN GASTEL *et al.*, 2011; YAO *et al.*, 2003) e PDL (ALHASHIMI *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2007; OKADA *et al.*, 1997; SHIMIZU *et al.*, 1992). Estudos *in vitro* demonstram que IL-6 é induzida após 12 horas de aplicação de compressão estática nas células do PDL humano (LEE *et al.*, 2007) e tem seus níveis potencializados por citocinas pró-inflamatórias, tais como Interleucina-1 $\beta$  (OKADA *et al.*, 1997; SHIMIZU



*et al.*, 1992), Interleucina-1 $\alpha$  (OKADA *et al.*, 1996; SHIMIZU *et al.*, 1992) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (OKADA *et al.*, 1996). Em Ratos Wistar, a força ortodôntica induziu no PDL a produção e IL-6 no dia 3, seguido por uma redução no dia 7, alcançando níveis semelhantes ao controle no dia 10 (ALHASHIMI *et al.*, 2001). Estudos com o GCF humano demonstraram, nos grupos experimentais, um aumento de IL-6 com 24 horas (REN *et al.*, 2007; UEMATSU *et al.*, 1996) e níveis semelhantes ao controle nos dias 7, 21 (BASARAN *et al.*, 2006), meses 2, 3 (REN *et al.*, 2007), 6 (BASARAN *et al.*, 2006) e 12 (VAN GASTEL *et al.*, 2011). Nossos resultados demonstram que a concentração da IL-6 aumentou após 15 horas e no 12<sup>o</sup> dia. No 21<sup>o</sup> dia, IL-6 alcançou níveis semelhantes ao controle. Nossos dados estão parcialmente de acordo com a literatura (REN *et al.*, 2007; UEMATSU *et al.*, 1996), entretanto, esta comparação é difícil de ser realizada devido as diferenças nos protocolos experimentais utilizados (ALHASHIMI *et al.*, 2001; BASARAN *et al.*, 2006; REN *et al.*, 2007; VAN GASTEL *et al.*, 2011). Em resumo, podemos considerar que a IL-6 é produzida no início da OTM e sua expressão é reduzida com o passar do tempo. Uma homeostase fisiológica é provavelmente alcançada por inibição através de *feedback* negativo (REN *et al.*, 2007). Nos estágios tardios, outros mediadores, tais como as quimiocinas (ALHASHIMI *et al.*, 1999; ANDRADE *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2009; GARLET *et al.*, 2008), devem regular o processo de remodelação óssea. De forma interessante, IL-6 é capaz de induzir a expressão de CCL2 (ALHASHIMI *et al.*, 1999) e potencializar os efeitos de CCL3 na formação dos osteoclastos (HAN *et al.*, 2001).

As quimiocinas CC ligantes 2 e 3 (CCL2 e CCL3, previamente conhecidas como proteína quimiotática de monócitos-1/MCP-1 e proteína inflamatória de macrófagos-1 alfa/MIP-1 $\alpha$ ), guiam a migração de osteoclastos aos tecidos ósseos através de interação com receptores de quimiocinas tais como CCR2 ou CCR5/CCR1, respectivamente,

expressos na superfície dos osteoclastos (BAGGIOLINI *et al.*, 1997; BARILÉ-NION; BATAILLE, 2003; RODY *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2007). Além disso, CCL2 e CCL3 induzem a diferenciação, ativação e atividade de reabsorção dos osteoclastos (CUI; MADDEDDU., 2001; BARILÉ-NION; BATAILLE, 2003; SILVA *et al.*, 2007). Estudos *in vitro* com células de PDL humano demonstraram que a indução de estresse por estiramento intermitente aumentou a expressão de CCL2 e CCL3 (GOTO *et al.*, 2011). Em estudos em camundongos, a aplicação de força mecânica elevou significativamente os níveis da quimiocina CCL2 após 12 horas (ANDRADE *et al.*, 2007), e de CCL2 e CCL3 após o 3<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dias (ANDRADE *et al.*, 2009), alcançando níveis semelhantes ao controle no 10<sup>o</sup> dia (ALHASHIMI *et al.*, 1999). Nós não encontramos estudos que avaliaram a expressão de CCL2 e CCL3 no GCF. Em um estudo empregando-se PDL humano, foram avaliados os níveis quimiocinas após o tratamento ortodôntico. O grupo experimental consistiu de uma amostra de pacientes submetidos à disjunção palatina, com força ortopédica, seguida da exodontia de primeiros pré-molares superiores. O grupo controle consistiu de pré-molares extraídos por razões ortodônticas, de pacientes diferentes do grupo experimental, que não foram submetidos a tratamento ortodôntico prévio. Os resultados demonstraram que os níveis de CCL2 e CCL3 encontraram-se aumentados após a disjunção palatina tanto no lado de compressão quanto no de tensão, comparados com o grupo controle. Os níveis de CCL2 e CCL3 estavam mais elevados no lado de compressão do PDL (GARLET *et al.*, 2008). Embora nosso estudo tenha utilizado forças leves, e não comparou o lado de compressão *versus* o de tensão, nossos resultados também demonstram que o grupo experimental apresentou níveis elevados de CCL2 (3<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dias) e CCL3 (12<sup>o</sup> dia) no PDL humano. Portanto, a transdução mecânica deve ser responsável pela liberação inicial de IL-6 após 15 h, o que pode estar associada à indução de CCL2 no 3<sup>o</sup> dia.

Ambas as moléculas devem ativar o recrutamento de células da linhagem de monócitos/macrófagos para o lado de compressão e contribuir para a formação de osteoclastos (BARILE-NION, BATAILLE, 2003; CUI; MADEDDU, 2011; MACKIEWICZ *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2007; UEMATSU *et al.*, 1996). Neste sentido, um número significativo de pré-osteoclastos foram observados no PDL e superfície óssea no dia 3 (RODY *et al.*, 2001). No 7<sup>o</sup> dia, a análise histológica, realizada por outros autores, não evidencia reabsorção frontal ou movimentação dentária devido à compressão do PDL e deflexão óssea (BUCK; CHURCH, 1972). De maneira contrária, no dia 14, achados histológicos revelam um aumento do espaço do PDL, atividade de reabsorção óssea frontal e movimentação dentária (BUCK; CHURCH, 1972). Estes achados podem estar associados à indução de IL-6, CCL2 e CCL3, observados no 12<sup>o</sup> dia no presente estudo. No 21<sup>o</sup> dia, pouca ou nenhuma atividade osteoclástica está presente e não se observa reabsorção frontal, nem à distância (BUCK; CHURCH, 1972). Este cenário pode se relacionar aos baixos níveis de IL-6, CCL2 e CCL3 alcançados no 21<sup>o</sup> dia neste estudo.

Após a aplicação de força ortodôntica, tanto o estiramento/compressão da matriz e mudanças no fluxo do fluido no PDL e osso causam deformação das células locais (HENNEMAN *et al.*, 2008). A redução do fluxo sanguíneo é capaz de alterar o ambiente químico, dentro de poucas horas, e assim modificar a atividade celular (DAVIDOVITCH; SHAMFIELD, 1975). Através da sinalização por receptores tipo integrina e outras vias de transdução, mediadores são produzidos para ativar as células (fibroblastos, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) envolvidas no processo de remodelação óssea (DIERCKE *et al.*, 2011; HENNEMAN *et al.*, 2008; PROFF; ROMMER, 2009) durante a OTM. (MASELLA; MEISTER, 2006). Os osteoclastos são as células envolvidas no processo de reabsorção. As evidências demonstram que estas

células são originadas de precursores (monócitos e macrófagos) localizados no próprio PDL em uma fase inicial do movimento dentário, e também do tecido hematopoiético, medula óssea adjacente ao osso alveolar onde a força foi aplicada, em uma fase mais tardia (RODY *et al.*, 2001). O processo de reabsorção óssea durante a OTM ocorre de duas formas: reabsorção frontal e/ou à distância (BUCK *et al.*, 1972). A reabsorção frontal está associada a aplicação de forças leves (0.490-0.890 N), preservação de células do tecido e permeabilidade vascular. A reabsorção à distância e hialinização estão associadas a forças pesadas (necrosantes) que causam o esmagamento do PDL, morte celular, hemostase e conseqüente ausência de células no PDL e osso alveolar adjacente (MASELLA; MEISTER, 2006). Infelizmente, durante a OTM, algum grau de hialinização parece ser inevitável (BUCK; CHURCH, 1972, KUROL; OWMAN-MOLL, 1998; MEIKLE, 2006), mesmo com forças tão baixas quanto 0.294 N (MEIKLE, 2006). Estas áreas hialinizadas podem durar de 4 a 49 dias (BUCK *et al.*, 1972; KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006; KUROL; OWMAN-MOLL, 1998; MEIKLE, 2006; REITAN, 1957). Um atraso inevitável do movimento dentário ocorre devido ao atraso na indução da diferenciação celular. Assim, uma considerável espessura de tecido ósseo precisa ser removida antes que qualquer movimento dentário ocorra (BUCK *et al.*, 1972; DAVIDOVITCH, 1991; KRISHNAN; DAVIDOVITCH *et al.*, 2006; HENNEMAN, 2008). Como resultado, há a ativação de células participantes na remoção da área hialinizada e osso alveolar, levando a remodelação do periodonto comprimido (ALHASHIMI *et al.*, 1999; BUCK *et al.*, 1972; DAVIDOVITCH, 1991; KRISHNAN; DAVIDOVITCH *et al.*, 2006; MEIKLE, 2006). Os osteoclastos devem ser formados para reabsorver as áreas hialinizadas e as adjacentes ao dente, enquanto osteoblastos são necessários para formar novo tecido ósseo no lado de tensão (BUCK *et al.*, 1972; KRISHNAN; DAVIDOVITCH *et al.*, 2006; MEIKLE, 2006; VON BOHL;

KUIJPERS-JAGTMAN, 2009). Sendo assim, durante as diferentes fases da movimentação dentária, mudanças estruturais no osso e tecido periodontal ocorrem, alterando o ambiente biomecânico (BUCK *et al.*, 1972; VON BOHL; KUIJPERS-JAGTMAN, 2009), o que leva a modulação da resposta biológica (VON BOHL; KUIJPERS-JAGTMAN, 2009). Estes eventos podem explicar os diferentes padrões de expressão de citocinas e quimiocinas nos diferentes tempos avaliados neste estudo.

De forma geral, estudos em humanos relacionados a OTM apresentam algumas limitações: (1) A análise histológica de material humano é limitada pelo fato de que os dentes submetidos à força que devem ser extraídos, tem seu PDL danificado, enquanto que o osso alveolar adjacente não pode ser analisado (VON BOHL; KUIJPERS-JAGTMAN, 2009); (2) A variação interindividual na resposta mecanobiológica é provavelmente devido as diferenças na população das células do PDL e osso, genoma, e padrão de expressão das citocinas (MASELLA; MEISTER, 2006); (3) Existem poucos estudos disponíveis (com aplicação de protocolos experimentais distintos), demonstrando a expressão de citocinas/quimiocinas com amostra de PDL humano durante a OTM. Além destes fatores, o presente trabalho apresenta as seguintes limitações: (1) Apesar de todo o ligamento periodontal ter sido coletado, o volume obtido para amostra foi pequeno. Sendo assim, somente três mediadores inflamatórios puderam ser avaliados por ELISA; (2) Embora a força aplicada neste estudo teve direção vestibulo-apical, a distribuição desta força não ocorre de forma homogênea no PDL (TANNE K *et al.*, 1987). Além disso, variações biológicas interindividuais podem estar associadas com o tamanho da raiz e do osso que circundam o dente (MELSEN, 1999). (3) Cinco tempos de aplicação de força durante OTM foram avaliados, havendo assim, a necessidade de investigação de outros tempos. Neste sentido, sugerimos a investigação em 24 horas, quando se observou em outros estudos um pico de expressão

de citocinas no GCF (REN *et al.*, 2007; UEMATSU *et al.*, 1996); no 7<sup>o</sup> dia, quando a análise histológica indica o início do processo de reabsorção óssea à distância; e no 28<sup>o</sup> dia, quando atividade osteoclástica não é evidente e poucos osteoclastos são observados (BUCK; CHURCH, 1972).

O conhecimento referente ao processo de remodelação óssea é primordial para o planejamento, conduta terapêutica e prevenção de efeitos colaterais (dor, reabsorção radicular apical externa, movimento dentário solapante, dentre outros) durante o tratamento ortodôntico. A literatura tem contribuído ao esclarecer os eventos moleculares e celulares deste processo. Entretanto, o aprofundamento deste conhecimento é necessário para desvendar o modo de interação entre moléculas de sinalização e células envolvidas na remodelação do periodonto e osso alveolar. O conhecimento obtido, pode ter potencial aplicação para interferência no OTM, mas também em doenças ósseas inflamatórias.

## **5 Conclusão**

Este estudo demonstrou picos de expressão de IL-6, CCL2 e CCL3 nos diferentes tempos após a aplicação de força ortodôntica. Estes achados podem ser indicativos de diferentes papéis desempenhados por estas moléculas no processo de remodelação óssea e periodontal.

## **6 Perspectivas**

Com base nos achados deste estudo, algumas perguntas motivam a continuidade deste trabalho:

### **1 – Qual a correlação entre a expressão de moléculas sinalizadoras no GCF e PDL.**

O GCF representa mudanças indiretas que ocorrem no PDL (REN *et al.*, 2008), pois há uma constante renovação do fluido crevicular gengival, além da presença de outros elementos celulares e bactérias. Entretanto, possui a vantagem de ser não invasivo e permitir sua coleta durante todo o tratamento ortodôntico (KRISHNAN *et al.*, 2006; BASARAN *et al.*, 2006; REN *et al.*, 2008; VAN GASTEL *et al.*, 2011). Não há estudos que correlacionam os níveis de expressão de citocinas e quimiocinas no PDL e GCF. Caso a correlação exista, o GCF poderá ser utilizado, no futuro, como marcador para avaliar as mudanças ocorridas durante o processo de remodelação óssea, e potencialmente ser empregado na avaliação do tratamento e no monitoramento de efeitos indesejáveis. Para esclarecer esta questão, pretende-se coletar amostras de GCF antes da coleta do PDL para avaliação da expressão de citocinas nestes dois sítios de coleta.

### **2 – Qual a expressão de outros mediadores inflamatórios envolvidos na remodelação óssea durante o tratamento ortodôntico?**



Os níveis tissulares de IL-6, CCL2 e CCL3 foram avaliados por ELISA neste trabalho. A utilização da técnica de *Polimerase Chain Reaction* (real-time PCR) nos permitirá avaliar a expressão de outros marcadores no nível de mRNA, como por exemplo RANK, RANKL, OPG, RANTES e MIP-2 os quais estão diretamente relacionados à regulação da atividade osteoclástica (ALHASHIMI *et al.*, 1999; KANZAKI *et al.*, 2006; OSHIRO *et al.*, 2002; YASUDA *et al.*, 1998).

### **3 – Testes *in vitro***

Seria também importante a realização de estudos *in vitro* com células de PDL humano submetidas a diferentes tipos de força para a avaliação da cinética de liberação de moléculas sinalizadoras e potencial interferência terapêutica neste sistema.

## Referências Bibliográficas

Adams DH, Lloyd AR. (1997). Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* 349:490–5.

Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M. (1999). Chemokines are upregulated during orthodontic tooth movement. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 19:1047–1052.

Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M. (2001). Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 119:307-12.

Anastasi G, Cordasco G, Matarese G, Rizzo G, Nucera R, Mazza M, Militi A, Portelli M, Cutroneo G, Favalaro A. (2008). An immunohistochemical, histological, and electron-microscopic study of the human periodontal ligament during orthodontic treatment. *Int J Mol Med* 21(5):545-54.

Andrade I Jr, Silva TA, Silva GA, Teixeira AL, Teixeira MM. (2007). The role of tumor necrosis factor receptor type 1 in orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 86(11):1089-94.

Andrade I Jr, Taddei SRA, 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):1037-1041, 2009

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. (1997). Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15:675–705.

Barillé-Nion S, Bataille R. (2003). New insights in myeloma-induced osteolysis. *Leuk Lymphoma* 44(9):1463–7.

Başaran G, Ozer T, Kaya FA, Hamamci O. (2006). Interleukins 2, 6, and 8 levels in human gingival sulcus during orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 130(1):7.e1-6.

Buck DL, Church NH. (1972). A histologic study of human tooth movement. *Am J Orthod* 62(5):507-16.

Capelli Junior J, Kantarci A, Haffajee A, Teles RP, Fidel R Jr, Figueredo CM. (2011). Matrix metalloproteinases and chemokines in the gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod* 33(6):705-11

Cui Y, Madeddu P. (2011). The Role of Chemokines, Cytokines and Adhesion Molecules in Stem Cell Trafficking and Homing. *Curr Pharm Des* 17(30):3271-9. Review.

Davidovitch Z, Shamfield JL. (1975). Cyclic nucleotide levels in alveolar bone of orthodontically treated cats. *Arch Oral Biol* 20: 567-574.

Davidovitch Z, Finkelson MD, Steigman S, Shanfeld JL, Montgomery PC, Korostoff E. (1980). Electric currents, remodeling and orthodontic tooth movement. I. The effect of electric currents on periodontal cyclic nucleotide levels. *Am J Orthod* 77:14-32.

Davidovitch Z, Finkelson MD, Steigman S, Shanfeld JL, Montgomery PC, Korostoff E. (1980). Electric currents, remodeling and orthodontic tooth movement. II. Increase in rate of tooth movement and periodontal cyclic nucleotide levels by combined force and electric current. *Am J Orthod* 77:33-47.

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

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

Daskalogiannakis J, McLachlan KR. (1996). Canine retraction with rare earth magnets: an investigation into the validity of the constant force hypothesis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 109:489-95.

Krishnan V, Davidovitch Z. (2006). Cellular, molecular, and tissue level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 129:e1-32

Diercke K, Kohl A, Lux CJ, Erber R. (2011). Strain-dependent up-regulation of ephrin-B2 protein in periodontal ligament fibroblasts contributes to osteogenesis during tooth movement. *J Biol Chem* 286(43):37651-64.

Garlet TP, Coelho U, Silva JS, Garlet GP. (2007). Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J Oral Sci* 115:355-62.

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

Gianelly AA, Goldman HM. (1971). Tooth movement. In: Biological basis of orthodontics. *Philadelphia: Lea and Febiger* 116-204.

Goto KT, Kajiya H, Nemoto T, Tsutsumi T, Tsuzuki T, Sato H, Okabe K. (2011). Hyperocclusion stimulates osteoclastogenesis via CCL2 expression. *J Dent Res* Jun;90(6):793-8.

Han JH, Choi SJ, Kurihara N, Koide M, Oba Y, Roodman GD. (2001). Macrophage inflammatory protein-1alpha is an osteoclastogenic factor in myeloma that is independent of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand. *Blood* 1;97(11):3349-53.

Haug SR, Brudvik P, Fristad I, Heyeraas KJ. (2003). Sympathectomy causes increased root resorption after orthodontic tooth movement in rats: immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* 313(2):167-75.

Henneman S, Von den Hoff JW, Maltha JC. (2008). Mechanobiology of tooth movement. *Eur J Orthod* Jun;30(3):299-306.

Iwasaki LR, Haack JE, Nickel JC, Morton J. (2000). Human tooth movement in response to continuous stress of low magnitude. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 117(2):175-83.

Kitase Y, Yokozeki M, Fujihara S, Izawa T, Kuroda S, Tanimoto K, Moriyama K, Tanaka E. (2009). Analysis of gene expression profiles in human periodontal ligament cells under hypoxia: the protective effect of CC chemokine ligand 2 to oxygen shortage. *Arch Oral Biol* 54(7):618-24.

Kanzaki H, Chiba M, Arai K, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M, Mitani H. (2006). Local RANKL gene transfer to the periodontal tissue accelerates orthodontic tooth movement. *Gene Ther* 13(8):678-85.

Kurol J, Owman-Moll P. (1998). Hyalinization and root resorption during early orthodontic tooth movement in adolescents. *Angle Orthod* 68(2):161-5.

Lee KJ, Park YC, Yu HS, Choi SH, Yoo YJ. (2004). Effects of continuous and interrupted orthodontic force on interleukin-1beta and prostaglandin E2 production in gingival crevicular fluid. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 125(2):168-77.

Lee YH, Nahm DS, Jung YK, Choi JY, Kim SG, Cho M, Kim MH, Chae CH, Kim SG. (2007). Differential gene expression of periodontal ligament cells after loading of static compressive force. *J Periodontol* 78(3):446-52.

Mackiewicz Z, Niklińska WE, Kowalewska J, Chyczewski L. (2011). Bone as a source of organism vitality and regeneration. *Folia Histochem Cytobiol* 49(4):558-69.

Masella RS, Meister M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006 Apr;129(4):458-68. Review

Meikle MC. (2006). The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod* 28:221-40.

Melsen B. Biological reaction of alveolar bone to orthodontic tooth movement. (1999). *The Angle Orthodontist* 69 (2) pp.121:158.

Okada N, Kobayashi M, Mugikura K, *et al.* (1997). Interleukin-6 production in human fibroblasts derived from periodontal tissues is differentially regulated by cytokines and a glucocorticoid. *J Periodontol Res* 32:559-69.

Oshiro T, Shiotani A, Shibasaki Y, Sasaki T. (2002). Osteoclast induction in periodontal tissue during experimental movement of incisors in osteoprotegerin-deficient mice. *Anat Rec* 1;266(4):218-25.

Proff P, Römer P. (2009). The molecular mechanism behind bone remodelling: a review. *Clin Oral Investig* 13(4):355-62.

Reitan K. (1957). Some factors determining the evaluation of forces in orthodontics. *Am J Orthod* 43:32-51.

Ren Y, Maltha JC, Van't Hof MA, Von Den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM, Zhang D. (2002). Cytokine levels in crevicular fluid are less responsive to orthodontic force in adults than in juveniles. *J Clin Periodontol* 29(8):757-62.

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

Ren Y, Hazemeijer H, de Haan B, Qu N, de Vos P. (2007). Cytokine profiles in crevicular fluid during orthodontic tooth movement of short and long durations. *J Periodontol* 78(3):453-8

Ren Y. (2008). Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. *Eur J Oral Sci* 116:89-97.

Rody WJ Jr, King GJ, Gu G. (2001). Osteoclast recruitment to sites of compression in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 120:477-

Rygh, P. (1976). Ultrastructural changes in tension zones of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. *Am. J. Orthod* 70, 269–281.

Shimizu N, Ogura N, Yamagushi M, Goseky T, Shibata Y, Abiko Y, Iasawa T, Takiguchi H. (1992). Stimulation by interleukin-1 of interleukin-6 production by human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol.* 37(9):743-8.

Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. (2007). Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res* 86:306–19.

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

Tanne K; Sakuda M; Burstone CJ. (1987). Three-dimensional finite element analysis for stress in the periodontal tissue by orthodontic forces. *Am J Orthod Orthop* 92: 499-505.

Uematsu S, Mogi M, Deguchi T. (1996). Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 75(1):562-7.

van Gastel J, Teughels W, Quirynen M, Struyf S, Van Damme J, Coucke W, Carels C. (2011). Longitudinal changes in gingival crevicular fluid after placement of fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 139(6):735-44.

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

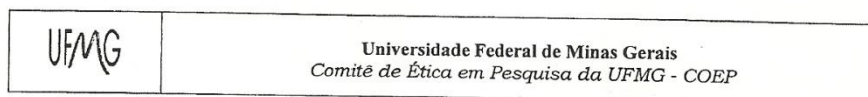
Yao YL, Feng XP, Jing XZ. (2003). The correlation between tooth pain and bioactivators changes in gingival crevicular fluid after applying orthodontic stress. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 12(5):331-3.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Yasuda. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31;95(7):3597-602



## Anexos

### Anexo I – Parecer do Comitê de Ética



#### Parecer nº. ETIC 372/07

**Interessado(a): Profa. Elizabeth Maria Bastos Lages**  
**Departamento de Odontopediatria e Ortodontia**  
**Faculdade de Odontologia-UFMG**

#### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 27 de novembro de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Biologia dos movimentos dentários**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**

**Anexo II – Comprovante de aceitação do artigo à revista AJO-DO**

**Date:** 05/14/2012  
**To:** "Tarcilia A Silva" silva.tarcilia@gmail.com  
**From:** "American Journal of Orthodontics" ckburke@aol.com  
**Subject:** Your Submission AJODO-D-12-00080R1

---

Ms. Ref. No.: AJODO-D-12-00080R1  
Title: Kinetics of IL-6, CCL2 and CCL3 expression of the periodontal tissues during orthodontic tooth movement  
American Journal of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics

Dear Professor Silva,

Thank you for resubmitting the revised version of your manuscript. I sent the most recent revision back to the original referees, who are now satisfied that all necessary changes have been made and they recommend acceptance and publication of your research in the AJO-DO. Congratulations.

I look forward to seeing the article in the AJO-DO. When we approach the publication date, I will send you more information about the proofing process and your publication date.

With kind regards,

Vincent G. Kokich  
Editor-in-Chief  
American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics

---