SIMONE PEIXE FRIEDRICHSDORF

**Efeito do LED infravermelho sobre a movimentação
dentária induzida em ratos**

São Paulo

2015

SIMONE PEIXE FRIEDRICHSDORF

Efeito do LED infravermelho sobre a movimentação

dentária induzida em ratos

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Ortodontia

Orientadora: Profa. Dra. Gladys Cristina Dominguez-Morea

São Paulo

2015

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.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Friedrichsdorf, Simone Peixe.

Efeito do LED infravermelho sobre a movimentação dentária induzida em ratos / Simone Peixe Friedrichsdorf ; orientador Gladys Cristina Dominguez-Morea. -- São Paulo, 2015.

64p. : 14 fig., 2 tab., 1 graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Ortodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão Corrigida

1. Movimentação dentária. 2. Laser. 3. Reabsorção de dente. 4. Microtomografia. 5. Ratos. I. Dominguez-Morea, Gladys Cristina. II. Título.

Friedrichsdorf SP. Efeito do LED infravermelho sobre a movimentação dentária induzida em ratos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu marido **Marcelo**, meu amor. O companheirismo, a colaboração, o carinho e a atenção sempre presentes em nossas vidas. Muito obrigada por todo o apoio e incentivo. Agradeço sua imensa compreensão. Obrigada por estar sempre ao meu lado, e por todo o seu otimismo e paciência.

Aos meus pais, **Maria e Milton** por me ensinar a ser persistente e manter a cabeça sempre erguida.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Gladys Cristina Dominguez-Morea por ter aceitado ser a minha orientadora, e ter me confiado um trabalho dessa grandeza, acreditando na minha capacidade.

Agradeço pelo crescimento profissional que a sra. tem me oferecido e pela sua disponibilidade.

E obrigada por todos os elogios e incentivo.

(Obrigada por sempre responder meus e-mails com prontidão!!!!)

Ao Professor Doutor Victor Elias Arana-Chavez,

pelo apoio a minha pesquisa, e me ajudar.

Obrigada por todo o conhecimento que o sr me transmitiu em aulas e no laboratório.

Obrigada pela sua atenção ao meu trabalho e sua disponibilidade.

À Doutora Vivian Bradaschia

Agradeço sua atenção ao meu trabalho, em todas as fases você esteve presente e me ofereceu ajuda e sugestões.

Participou ativamente da realização desta pesquisa e me ensinou muito, sempre foi muito dedicada e sincera.

À Elisângela Chinen

Agradeço toda sua ajuda e dedicação ao meu trabalho. Sempre disposta e atenciosa.

Agradeço por ter acompanhado todas as fases do meu projeto e me auxiliado em grande parte delas.

Aos **Professores Doutores da disciplina de Ortodontia da Universidade de São**

Paulo Prof. Dr. João Batista de Paiva, Prof. Dr. André Tortamano, Prof. Dr. Jorge
Abrão, Prof Dr. José Rino Neto, Profa. Dra. Lylian Kanashiro, Profa. Dra. Solange
Mongelli de Fantini, pela amizade e pelo conhecimento científico compartilhado.

Às minhas amigas da Clínica de MBT

Daniella Prado, Taiana Baldo, Fernanda Amorim e Mariana Galvão.

Obrigada pela ajuda e apoio constante.

Ao **Prof. Dr. Fausto Medeiros e a Profa. Dra. Mariana Braga**, pela dedicação,
disponibilidade e ensinamento.

Agradeço ao **Prof Dr. Jarbas Bauer**, pela amizade e transferência de
conhecimento.

Agradeço as secretárias, **Edina Brito , Viviane Tkacsuk e Edilaine** pela amizade,
atenção e carinho.

Agradeço aos técnicos **Simone Ferreira (IBUSP), Márcio (IBUSP), Edilson
(FOUSP) e Ronaldo (FOUSP)**

À bibliotecária **Glauci Elaine Damásio** pela disponibilidade e profissionalismo.

À todos os **funcionários da FOUSP.**

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES)**, pela
bolsa de estudo concedida.

*“ Eu sou o tipo da pessoa que,
se você me fizer uma pergunta e eu não souber a resposta,
eu vou te dizer que eu não sei.
Mas eu vou apostar com você que eu sei como encontrar a resposta,
e eu vou encontra-la”*

Chris Gardner (Will Smith – Á procura da felicidade)

RESUMO

Friedrichsdorf SP. Efeito do LED infravermelho sobre a movimentação dentária induzida em ratos. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

O LED infravermelho tem sido considerado uma alternativa efetiva para o laser na bioestimulação. Entretanto, o efeito na remodelação óssea durante o movimento ortodôntico ainda deve ser esclarecido. Oitenta ratos machos com 10 semanas de idade, foram divididos em dois grupos de 40 animais cada: grupo LED (GLED) e grupo controle (GCON), e tiveram seu 1º molar superior esquerdo submetido a força de 10 g com uma mola helicoidal fixada entre o 1º molar superior esquerdo e incisivo superior esquerdo. Durante os primeiros cinco dias de movimentação dentária foi aplicada a luz infravermelha LED (850nm, 30mW) durante 5 minutos no GLED. O GCON não foi irradiado. Em 0, 7, 14 e 21 dias, 5 animais de cada grupo foram submetidos a microtomografia computadorizada. Para a avaliação histológica, todos os ratos foram subdivididos em subgrupos de 20 animais cada de acordo com a o dia da eutanásia 4, 7, 14 e 21 dias e as maxilas foram dissecadas e processadas para a microscopia de luz (HE e TRAP). A quantidade de movimento, segundo as microtomografias computadorizadas, foi maior no grupo LED em T1 (intervalo entre os dias 0 e 7) e em T3 (intervalo entre os dias 14 e 21). No dia 4 foi observada hialinização na área de pressão em ambos os grupos; nos períodos posteriores, 7, 14, a área hialina foi vista apenas no grupo controle. A reabsorção radicular ocorreu em ambos os grupos após o dia 7. A fototerapia LED melhora a movimentação dentária e minimiza a hialinização durante o movimento ortodôntico. Entretanto, não reduz o risco de reabsorção da superfície radicular.

Palavras-chave: Movimentação dentária. Lasers. Reabsorção. Microtomografia por Raio-X

ABSTRACT

Friedrichsdorf SP. Infrared LED phototherapy effects on induced tooth movement in rats. [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

Infrared LED has been considered an effective alternative to infrared LASER for biostimulation purposes. However, its effect on bone remodeling during orthodontic tooth movement (OTM) is unknown. Eighty 10 week-old male Wistar rats were divided into two groups of forty animals each: LED group (GLED) and control group (GCON) and had a coiled spring bonded to the first upper molar and upper incisor exerting 10g force to mesially move the molar. During the first five days of OTM the maxillae were daily irradiated with infrared LED (850nm, 30mW) during 5 minutes (LED group). The controls were not irradiated (GCON). At 0, 7, 14 and 21 days, 5 LED group and 5 CON group rats were submitted to μ CT. For the histological study, all rats were subdivided into subgroups of 20 animal each according to the euthanasia day 4, 7, 14 e 21 days. The rats were euthanized after 4, 7, 14 and 21 days and the maxillae were processed to light microscopy and TRAP histochemistry. The amount of tooth movement was greater in the GLED on days 7 and 14. At 4 day, hyalinization was seen at the pressure areas in both groups; on the subsequent days it was seen only in the GCON. Root resorption occurred in both groups after 7 days. LED phototherapy enhances early tooth movement and minimizes periodontal hyalinization during OTM. However, it does not reduce the risk of tooth resorption.

Keywords: Tooth movement. Lasers. Resorption. Hyalinization. X-Ray microtomography

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EDTA	do inglês <i>ethylenediaminetetraaceticacid</i>
GaAIs	Arseneto de Gálio e Alumínio
HE	Hematoxilina e Eosina
Laser	acrônimo de <i>light amplification by stimulated emission of</i>
LED	<i>radiation</i> acrônimo de <i>light emitting diode</i>
MDI	movimentação dentária induzida
TRAP	sigla em inglês para <i>tartrate-resistant acid phosphatase</i>
RANK	sigla em inglês para <i>receptor activador of NFkB</i>
RANKL	sigla em inglês para <i>receptor activador of NFkB ligand</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

cN	centiNewton
g	grama
%	porcentagem
pH	potencial Hidrogeniônico
°C	grau Celsius
mg	miligrama
ml	milimetro
μl	microlitro
mM	miliMolar
s	segundos
nm	nanometro
μTC	microtomografia
M	molar
cm ²	centímetro quadrado
mW	microwatts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Remodelação óssea.....	15
2.2 O estudo do movimento dentário induzido	16
2.3 Lasers.....	17
2.4 LEDS.....	18
2.5 MDI e a luz infravermelha (pesquisas em animais).....	21
2.6 MDI e a luz infravermelha (estudos clínicos)	23
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Caracterização e manipulação da amostra.....	26
4.2Configuração montagem e ativação do dispositivo	28
4.3Aplicação do LED	31
4.4Condições ambientais	32
4.5 Quantificação da movimentação com μ TC.....	32
4.6 Processamento do material	34
5 RESULTADOS.....	37
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXOS	65

1 INTRODUÇÃO

A biologia da movimentação dentária induzida (MDI) envolve estudos de tecidos, de células e eventos moleculares que afetam a estrutura periodontal, que pode ser influenciada pelos fatores físicos, químicos e biológicos. Há uma constante busca por mecanismos para acelerar a movimentação ortodôntica sem induzir efeitos deletérios transitórios ou permanentes como a hialinização e reabsorção radicular, respectivamente. Com esse propósito, estudos clínicos e em animais experimentais empregando a fototerapia tem sido extensivamente realizados.

O laser de baixa intensidade é a principal fonte de luz empregada na maioria dos estudos, e tem demonstrado clinicamente que reduz a dor ocasionada pela aplicação da força ortodôntica (Turhani et al., 2006; Tortamano et al., 2009; Bicakci et al., 2012; Domínguez; Vélasquez, 2013; Domínguez et al., 2015) e acelera a movimentação dentária (Youssef et al., 2008; Sousa et al., 2011; Genc et al., 2013; Domínguez et al., 2015). O efeito do laser na resposta tecidual durante a movimentação dentária induzida apresenta algumas controvérsias: alguns autores afirmam que a quantidade de movimento aumenta (Kawasaki; Shimizu, 2000; Fujita et al., 2008; Yoshida et al., 2009; Yamaguchi et al., 2010; Altan et al., 2012; Duan et al., 2012; Shirazi et al., 2015), enquanto outros autores não encontraram nenhuma diferença entre os grupos controle e experimental. (Seifi et al., 2007; Gama et al., 2010; Marquezan et al., 2010; Altan et al., 2012; Seifi et al., 2014). Os achados sobre a quantidade de reabsorção radicular também mostraram resultados conflitantes; alguns autores afirmam que a luz infravermelha diminui a reabsorção radicular (Fonseca et al., 2013; Seifi et al., 2014; Ekizer et al., 2015) enquanto outros autores não encontraram diferença entre os grupos. (Marquezan et al., 2013). Alguns autores afirmam que há um aumento do número de osteoclastos (Kawasaki; Shimizu, 2000; Fujita et al., 2008; Yoshida et al., 2009; Habib et al., 2010; Yamaguchi et al., 2010; Altan et al., 2012; Cossetin et al., 2013; Shirazi et al., 2015) entretanto outros afirmam a diminuição do número de células clásticas (Fonseca et al., 2013).

O LED (light emitting diode) é uma fonte de luz monocromática, não coerente e não colimada que tem sido recentemente empregada como uma

alternativa para o laser. Os LEDs possibilitam uma maior área de aplicação e um baixo custo comparado com o laser, e têm sido clinicamente empregados na dentística com diferentes propostas. Em Ortodontia, o LED aumenta significativamente a quantidade de movimentação dentária e reduz a dor dos pacientes (Esper et al., 2011). Assim como, reduz o número de osteoclastos no ligamento periodontal (Fonseca et al., 2013) e acelera o movimento dentário em ratos (Ekizer et al., 2015).

Alguns aspectos da movimentação dentária sob efeito do LED, como a hialinização do ligamento periodontal não tem sido investigado. Assim, o presente estudo tem como objetivo analisar o efeito da fototerapia LED durante a movimentação dentária induzida em ratos, avaliando a presença de reabsorção radicular bem como a hialinização no ligamento periodontal e correlacionar com a quantidade de movimento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Remodelação óssea

A remodelação do tecido conjuntivo mineralizado e não-mineralizado é essencial para a efetiva movimentação dentária. Forças mecânicas exercidas sobre o dente são transmitidas ao periodonto iniciando a atividade remodeladora que facilita a movimentação. A remodelação óssea durante a movimentação dentária induzida é um contínuo processo de equilíbrio caracterizado por reabsorção óssea no lado da compressão e deposição de osso no lado da tração.

O processo de remodelação óssea é resultado da interação entre as células ósseas, os osteoblastos e osteoclastos, e ocorre devido a identificação de mediadores químicos no microambiente ósseo.

Quando uma força é aplicada no ligamento periodontal promove diretamente a compressão ou estresse mecânico das células, quebrando seu equilíbrio e originando uma reação biológica. O estímulo mecânico do aparelho ortodôntico pode ser traduzido, biologicamente, na geração de proteínas livres dentro do pequeno espaço do ligamento periodontal, levando a produção de citocinas e mediadores químicos como as prostaglandinas e leucotrienos, presentes também no processo inflamatório e que ativam as células osteoblásticas, clásticas e macrófagos. Estas células participam do processo reabsortivo e de remodelação óssea (Santamaria Jr., 2009).

As células clásticas são responsáveis pela reabsorção dos tecidos mineralizados. Essas células derivam de células precursoras mononucleares, que quando ativadas se proliferam e, em seguida, funde-se originando as células multinucleadas. Essas células multinucleadas são ativadas pela interação RANKL-RANK. Com a ativação das células clásticas, o citoesqueleto dos osteoclastos se reorganiza, estabelecendo a polarização da célula, pela qual uma face se adere à matriz mineralizada formando uma zona de selamento, onde ocorrerá a dissolução dos cristais de mineral, pela acidificação do meio. Após a dissolução do mineral, os

componentes orgânicos são fagocitados e transportados para o lado oposto da célula (Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2009).

2.2 O estudo do movimento dentário induzido

A biologia da movimentação dentária compreende o estudo dos fenômenos teciduais, celulares e moleculares que ocorrem nas estruturas do ligamento periodontal e do osso alveolar. Quando um agente físico, químico ou biológico atua sobre as células, elas produzem substâncias (mediadores químicos) e se comunicam entre si e com os tecidos vizinhos, a fim de inibir ou anular tal ação. A reação frente a um agente leva a uma circunstancial quebra de homeostasia (equilíbrio celular fisiológico) e aumento da função, caracterizando o estresse celular (Santamaria Jr., 2009).

A primeira análise microscópica da movimentação dentária induzida foi realizada em 1904 e 1905 por Sandstedt em incisivos e caninos superiores de um cão, respectivamente, movimentados no sentido lingual e distal. Em 1954, Waldo & Rothblatt, utilizaram pela primeira vez ratos como modelos experimentais para a movimentação dentária induzida. Os autores analisaram microscopicamente as alterações teciduais após o movimento do primeiro e segundo molar superior. Reitan & Kvam, em 1971, compararam a reação tecidual após movimentação dentária induzida em humanos, macacos, cães e ratos e ressaltaram que em experimentos de pequena duração há possibilidade de comparação com os experimentos realizados em humanos (Davidovitch, 1991).

Até meados da década de 50 do século passado, poucos trabalhos empregavam roedores em experimentos de movimentação dentária induzida. Cães e macacos eram os animais de escolha nos estudos microscópicos da biologia do movimento dentário (Macapanpan et al., 1954). Com a evolução nos estudos experimentais, os ratos se firmaram como o modelo mais utilizado nos trabalhos que envolviam movimentação dentária experimental (Ren et al., 2004; Martins-Ortiz, 2004; Mavraganiet al., 2005; Santamaria et al., 2009; Fracalossi, 2009). Estes animais têm como vantagens menor custo de manutenção quando comparados aos

dos primatas, gatos e cães, e a possibilidade de emprego em larga escala devido ao curto período de procriação e as ninhadas com vários filhotes (Ren et al., 2004).

O dente mais estudado no movimento dentário induzido em ratos e válido para extrapolação em humanos é o primeiro molar superior murino. Quando esse dente sofre aplicação de uma força para mesial produz um movimento de inclinação (Martins-Ortiz, 2004; Santamaria et al., 2009; Fractalossi, 2009).

As molas fechadas empregadas na inclinação para mesial do primeiro molar superior permitem mensurar a força aplicada. Nos trabalhos analisados que utilizam este tipo de dispositivo a força varia entre 25 e 136cN (Macapanpanet al., 1954; Fractalossi, 2009). Este dispositivo também permite a utilização de molas com diferentes ligas metálicas, como o aço inoxidável e as ligas de níquel-titânio, podendo tornar as forças dissipantes ou mais contínuas, respectivamente.

É importante salientar que as forças mecânicas aplicadas aos dentes não são usadas para produzir movimento mecânico e sim para obter um estímulo biológico capaz de promover reações teciduais desejáveis, modificando a posição dentária de forma estável e duradoura (Consolaro, 2005).

2.3 Laser

O laser representa um dispositivo constituído por substâncias de origem sólida, líquida ou gasosa, que quando excitadas por uma fonte de energia produzem um feixe de luz, denominado de “raio laser”. Tal dispositivo é classificado na literatura, em duas categorias: lasers de alta potência ou cirúrgicos, com efeitos térmicos apresentando propriedades de corte, vaporização e hemostasia; e lasers de baixa potência ou terapêuticos, apresentando propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e de bioestimulação (Silva et al., 2007; Barros et al., 2008).

O comprimento de onda de um laser determina o modo de interação laser-tecido. Assim, dependendo da estrutura celular que se deseja atingir, é utilizado o comprimento de onda mais apropriado. O comprimento de onda referente ao laser visível (vermelho) é indicado para terapia de tecidos mais superficiais, como a pele e mucosas, já comprimentos de onda referente ao infravermelho, devido à

maior profundidade de penetração, pode interagir com estruturas mais profundas (Filho, 2003).

Atuando em nível celular, o laser de baixa potência provoca modificações bioquímicas, bioelétricas e bioenergéticas, aumentando o metabolismo, a proliferação e maturação celular, na quantidade de tecido de granulação e na diminuição dos mediadores inflamatórios, induzindo o processo de cicatrização (Silva et al., 2007).

O laser de baixa intensidade promove a proliferação das células do ligamento periodontal, aumento no número de osteoclastos e melhora na microcirculação local, dessa forma, acredita-se que o mesmo estimule a movimentação dentária (Cruz, 2004; Kawasaki; Shimizu, 2000; Youssef et al., 2007).

Estudos com fotobiomodulação laser apresentam resultados bastante controversos no que se refere à quantidade de movimentação ortodôntica devido à grande diversidade de parâmetros avaliados (Kawasaki; Shimizu, 2000; Seifi et al., 2007; Limpanichkul et al., 2006).

2.4 LED

LED, que é o acrônimo da expressão inglesa *Light Emitting Diode*, ou seja, Diodo Emissor de Luz, apesar de ser bem difundido na vida moderna, recentemente, vem sendo utilizado e investigado na área biológica.

O LED como fonte de luz apresenta diferença em relação ao laser. Uma dessas diferenças está na forma de gerar a luz, que no LED é tipicamente produzida por um mecanismo de emissão espontânea de radiação e no laser a emissão de luz é estimulada por uma substância radioativa, como gases de hélio-neônio (HeNe), arsenato de gálio ou arsenato de gálio-alumínio (GaAlAs) dentro outros (Milliset al., 2005). Desta distinção básica decorrem as diferenças estruturais e funcionais entre os dois dispositivos. Assim, três características principais diferenciam o tipo de luz decorrente de um dispositivo LED, daquele produzido pelo laser ou a luz comum: monocromático, não coerente e não colimado. Monocromático significa que toda a luz gerada pelo LED é de um único comprimento de onda e uma única cor.

Colimação faz referência à distribuição dos raios e acontece quando todos os fótons caminham de forma paralela na mesma direção, como ocorre com o *laser* e não com o LED. Assim, no laser, o feixe de luz mantém o diâmetro desde a origem até o fim (não divergente). A coerência da luz refere-se à forma como os fótons viajam no espaço e no tempo, e ocorre quando se têm ondas de um mesmo comprimento que são encaminhadas de forma sincrônica, como ocorre com o laser. Esta característica ocorre em menor proporção com a luz gerada pelo LED e não acontece com a luz comum, onde diversas ondas são emitidas de forma assincrônica, cada uma com diferente frequência e comprimento de onda (Milliset al., 2005; Mikail, 2009).

O LED trata-se de um diodo emissor de luz, que quando energizado emite luz de banda espectral estreita e não coerente. É uma luz com alto grau de pureza que permite a sua utilização sem a necessidade de filtros ópticos. São semicondutores, tendo como característica principal, conduzir corrente elétrica em um único sentido, apresentando duas regiões distintas, sendo a primeira receptora de elétrons denominada “p” e a segunda doadora de elétrons denominada “n”. Entretanto, para que a emissão de luz ocorra de forma duradoura e observável, ou seja, para que exista luminescência, uma fonte de eletricidade deve ser aplicada ao diodo. A luz emitida, portanto, se dá devido à energização da junção p-n por um processo denominado de eletroluminescência (Araújo, 2009).

A coerência da luz se perde nos primeiros estratos do tecido biológico. Este motivo revela que a coerência da luz pode não ser o fator preponderante para o efeito biomodulador positivo observado em terapias com luz coerente (Rubinov, 2005).

De forma geral, a luz é dispersada e distribuída difusamente à medida que penetra no tecido, fato que pode ser influenciado pela coerência da luz. Teoricamente, acredita-se que laser, LED e luz policromática não se dispersam nem se distribuem da mesma forma nos tecidos (Enwemeka, 2006). A penetração tecidual dos raios laser, usados nas terapias de baixa energia, tem sido definida em humanos e sabe-se que a coerência é diretamente proporcional à distribuição da luz nos tecidos: maior comprimento de onda, maior penetração (Milliset al., 2005; Mikail, 2009). Os autores atribuem os efeitos terapêuticos do laser a essa característica (Milliset al., 2005). Porém, evidências sugerem que não é esta propriedade física a responsável pelos efeitos anabólicos das fontes fotobiomoduladoras, uma vez que o

LED demonstrou ser terapeuticamente tão eficiente quanto o laser no reparo tecidual (Whelan et al., 2001, Desmet et al., 2006). Smith (1991) alega que é a radiação a responsável pelos efeitos fotobiológicos e/ou fotofísicos gerando respostas terapêuticas e não os dispositivos utilizados. Assim sendo, a distinção entre os dispositivos fotobiomoduladores, principalmente o LED e o laser, poderia ser feita pela coerência da luz propriamente dita e a coerência após interação biológica com os tecidos (Enwemeka, 2006). Fatores como a característica do tecido a ser irradiado deve ser levado em consideração, uma vez que o pêlo e o tipo de pele parecem influenciar na penetração da luz (Milliset et al., 2005).

O LED também difere do laser na quantidade de energia necessária para a geração da luz, sendo bem menor com o LED (Stahlet et al., 2000). Ainda, o *laser*, devido à colimação da luz possui uma limitada largura do feixe, dificultando o tratamento de grandes áreas de tecido. Alguns tipos de laser emitem uma quantidade de calor que poderia, potencialmente, produzir ou aumentar o dano nos tecidos. Em contraste, o LED pode ser construído em diferentes tamanhos para alcançar grandes áreas de tecido e não emitem calor, tornando-os uma fonte luminosa simples, prática e econômica (Desmet et al., 2006).

Contudo, os mecanismos que levam aos efeitos fotobiomoduladores nos diferentes tecidos ainda não são bem entendidos, mas é consenso de que o efeito parece depender do momento da irradiação (Karu, 1989; Pinheiro; Gerbi, 2006), sendo aparentemente mais efetivo nas fases iniciais de maior proliferação celular (Vincket et al., 2003, Matsuzaka et al., 2004, Huang et al., 2007). Deve ser considerado que o tratamento com laser parece funcionar nos casos de danos teciduais graves ou em estados patológicos (Karu, 1989; Smith, 1991; Brawn; Kwong-Hing, 2007).

Os efeitos fotobiomoduladores do LED nos tecidos e no metabolismo celular têm sido pesquisados *in vivo* (Vincket et al., 2003; Corazza et al., 2007), e *in vitro* (Vincket et al., 2003; Huang et al., 2007). *In vivo*, o LED tem sido utilizado no tratamento da dor e na reparação de tecidos com resultados satisfatórios (Whelan et al., 2001; Casalechiet et al., 2009).

Vinck et al. (2003) avaliaram a proliferação de fibroblastos *in vitro*, comparando diferentes tipos de LED com o laser e concluíram que tanto o LED

quanto o laser induzem efeitos benéficos ao nível celular. Efeitos similares nos fibroblastos foram reportados por Huang et al. (2007).

2.5 Movimentação Dentária Induzida e a luz infravermelha (pesquisas em animais)

A maioria dos estudos de movimentação dentária induzida com aplicação do laser em animais, preocuparam-se em quantificar a movimentação dentária; as investigações de Kawasaki e Shimizu (2000), Fujita et al. (2008), Yoshida et al. (2009), Yamaguchi et al. (2010), Ekizer et al. (2015), Shirazi et al. (2015), encontraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos na quantidade de movimentação, sobre o efeito da luz infravermelha. O estudo de Yoshida et al. (2009), verificou a movimentação dentária por meio de um μ TC *in vivo*; enquanto, Fujita et al. (2008), Yamaguchi et al. (2010), utilizaram modelos da maxila dos animais e usaram um software 3D para análise; Kawasaki e Shimizu (2000) fizeram a análise da quantidade de movimento por meio das imagens obtidas dos modelos da maxila (16 x ampliadas) e auxílio de um microscópio. Entretanto, os estudos de Seifi et al. (2014), Seifi et al. (2007), empregando coelhos como modelo experimental não encontraram nenhuma diferença entre os grupos controle e experimental. Os estudos Marquezan et al. (2013), Duan et al. (2012), Altan et al. (2012), Gama et al. (2010), Marquezan et al. (2010), utilizaram o mesmo modelo de movimentação dentária em ratos e empregaram um paquímetro para quantificar a movimentação do 1º molar superior, mas também, não verificaram nenhuma diferença estatisticamente significativa entre o grupo experimental (irradiado) e o grupo controle, em relação a quantidade de movimento dentário.

A maioria dos estudos complementaram a quantificação da movimentação dentária com uma investigação histológica, para verificar o efeito da aplicação da luz infravermelha sob os osteoclastos na remodelação óssea, do osso alveolar, no período da movimentação dentária induzida. Assim, Shirazi et al. (2015), com grupo experimental de 14 dias e coloração H&E, Altan et al. (2012), oito dias experimentais e avaliação das lâminas em H&E e imunohistoquímica, Kawasaki e Shimizu (2000), com 13 dias de movimentação e histoquímica TRAP, Yamaguchi et

al.(2010), sete dias de aplicação da força e avaliação com H&E, TRAP, e imunohistoquímica, observaram um maior número de osteoclastos, no grupo experimental. Marquezan et al.(2010), encontraram diferença entre os grupos, na avaliação histoquímica TRAP, observaram um aumento de osteoclastos no grupo irradiado, no período de 07 dias com aplicação diária de laser de baixa intensidade, Cossetin et al.(2013), empregando a coloração H&E, verificaram um aumento do número dos osteoclastos no grupo experimental, no período de 07 dias e que recebeu 3 aplicações do laser. Habib et al.(2010), também observaram no grupo irradiado, um maior número de osteoclastos nos dias 7 e 19, com a coloração H&E. Fonseca et al.(2013), também avaliaram o número de osteoclastos, encontraram um menor número de células clásticas no grupo tratado com LED no ligamento periodontal, com a coloração H&E.

Há poucas investigações em animais com objetivo de verificar as reabsorções dentárias; Fonseca et al.(2013) e Ekizer et al.(2015) encontraram uma diminuição das reabsorções radiculares na superfície radicular no grupo LED. Seifi et al.(2014), também, observaram uma redução na reabsorção radicular no grupo tratado com laser. Entretanto, Marquezan et al.(2013)verificaram uma intensa atividade de reabsorção radicular no grupo laser, após 7 dias.

A hialinização no ligamento periodontal é um outro aspecto importante durante a movimentação dentária induzida, que ocorre no lado da pressão, e que pode reduzir o movimento, mas, somente o estudo de Habib et al.(2012)notaram uma redução da hialinização depois de 19 dias de experimento em ambos os grupos, e no grupo irradiado com laser aumento da área hialina no dia 7 e redução dessa necrose estéril no dia 13, assim os autores concluíram que o laser aumenta a formação de áreas hialinas nos estágios iniciais da movimentação.

Sabe-se que o movimento ortodôntico só é possível com a remodelação óssea. Cossetin et al. (2013) mensuraram a distância da raiz (furca) e o osso alveolar intrarradicular, a maior distância entre esses pontos representava a maior perda óssea, sendo assim, os autores observaram que o grupo de 7 dias de movimentação com 3 aplicações de laser apresentaram uma significativa perda óssea em comparação aos demais grupos.

Os efeitos do laser na polpa dentária, foi um aspecto reportado apenas por Abi-Ramia et al. (2010); em seu estudo foram realizados cortes histológicos longitudinais e coloração H&E, e concluíram que a movimentação dentária induzida

associada ao laser de baixa potência mostrou uma hiperemia reversível como uma resposta tecidual ao estímulo e que o laser permite um reparo mais rápido do tecido pulpar durante a movimentação ortodôntica.

2.6 Movimentação dentária induzida e a luz infravermelha (estudos clínicos)

A sintomatologia dolorosa é um fator importante durante o tratamento ortodôntico. Muitos trabalhos clínicos avaliam a dor associada ao tratamento ortodôntico e a aplicação do laser (Domínguez et al., 2015; Hevari et al., 2014; Genc et al., 2013; Domínguez, 2013; Bicakci et al., 2012; Esper et al., 2011; Tortamano et al., 2009; Youssef et al., 2008; Turhani et al., 2006; Lim et al., 1995). A maioria desses trabalhos relatam uma diminuição da dor durante à aplicação de uma força ortodôntica e a fototerapia (Domínguez et al 2015, Domínguez et al 2013; Bicakci et al 2012, Tortamano et al., 2009; Youssef et al., 2008; Turhani et al., 2006; Esper et al., 2011). Entretanto, alguns autores concluíram que o emprego da luz infravermelha não alterou a sensação dolorosa do paciente ortodôntico (Hevari et al., 2014; Esper et al., 2011; Lim et al., 1995).

A duração total do tratamento ortodôntico é outro aspecto relevante, principalmente, para o paciente. Diminuir o tempo da terapia ortodôntica é desejável e muitos trabalhos clínicos investigam a fotobioestimulação durante o deslocamento dentário induzido (Domínguez et al., 2015; Hevari et al., 2014; Kansal et al., 2014; Genc et al., 2013; Sousa et al., 2011; Youssef et al., 2008; Limpanichkul et al., 2006; Cruz, 2004). Mas os resultados em relação a essa variável são conflitantes. A maioria das investigações relatam que a aplicação do laser altera a taxa de movimentação dentária (Domínguez et al., 2015; Genc et al., 2013; Sousa et al., 2011; Youssef et al., 2008; Cruz, 2004), outras investigações afirmam que não há diferença entre os grupos controle e experimental e concluíram que a o laser não altera a quantidade de movimento dentário (Kansal et al., 2014; Hevari et al., 2014; Limpanichkul et al., 2006).

Sabe-se que a reabsorção radicular é um efeito indesejável do tratamento ortodôntico. Nimeri et al (2014) investigaram, por meio de tomografias computadorizadas, as alterações na morfologia das raízes de pacientes ortodônticos

que receberam a fotobioestimulação LED; os autores observaram que a aplicação do LED não aumentou a reabsorção radicular. Sousa et al (2011) observaram radiografias periapicais de caninos que foram submetidos a retração e aplicação de laser, mas não encontraram nenhuma diferença estaticamente significativa entre os dentes, irradiados e não-irradiados.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo *in vivo* foi investigar o efeito do LED na superfície radicular e no ligamento periodontal, durante a movimentação dentária induzida em molares de ratos. Avaliando a presença de células clásticas na superfície da raiz e do osso alveolar e a presença de hialinização no ligamento periodontal. Adicionalmente, verificar o efeito da fototerapia sobre o deslocamento dentário.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade de São Paulo e aprovado em 16 de dezembro de 2013, protocolo registrado sob nº 028 / 2013. (Anexo A).

4.1 Caracterização e Manipulação da Amostra

Foram utilizados 80 ratos Wistar albinos, machos, com 10 semanas de vida e peso médio de 250 g. A fototerapia pode promover uma ação sistêmica, portanto, para avaliar o efeito da aplicação do LED na movimentação dentária induzida, faz-se necessário que o grupo controle seja distinto do grupo experimental. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (GCON) e grupo LED (GLED), com quarenta animais cada grupo. Os animais do GCON foram selecionados para caracterizar os aspectos histopatológicos da movimentação dentária induzida sem a influência do LED, e serviram de parâmetro para a comparação com os animais do GLED, os quais foram submetidos à movimentação dentária e à aplicação do LED. Cada grupo foi subdividido em 4 subgrupos, com 10 animais cada, de acordo com o momento da eutanásia (4,7,14, e 21 dias).

A sequência do estudo experimental está esquematizada na figura 4.1.

Figura 4.1 – Sequência do estudo experimental

4.2 Configuração - montagem e ativação do dispositivo ortodôntico

Para a realização da movimentação dentária foi utilizado um dispositivo proposto por Heller e Nanda (1979). O dispositivo ortodôntico era constituído por uma mola helicoidal de aço inoxidável de tração com 4mm de comprimento, e em cada extremidade da mola havia uma secção de fio de amarrilho 0,008" (Morelli®, Sorocaba, São Paulo, Brasil) para auxiliar na fixação do dispositivo aos dentes dos animais. A mola era distendida entre o primeiro molar superior esquerdo e os incisivos superiores, promovendo a mesialização do molar (Figura 4.2A e 4.2B).

Figura 4.2A – Desenho esquemático do aparelho proposto por Heller e Nanda (1979). 4.2B – Mola helicoidal entre o 1º molar superior esquerdo e o incisivo superior esquerdo

Para a montagem dos dispositivos, os animais foram anestesiados mediante uma associação de 12 ml/100g de cloridrato de cetamina (Cetamin®, Cotia, SP, Brasil), com 6 ml/100g de xilazina (Anasedan®, Paulínia, São Paulo, Brasil), por via intramuscular. Para as aplicações do LED, a dose anestésica era reduzida para um quarto da dose aplicada para a montagem do dispositivo ortodôntico, uma vez que era um procedimento que demandava menos tempo e não provocava dor.

Durante a montagem do aparelho, com a finalidade de facilitar o acesso à cavidade bucal do animal, esse era posicionado em decúbito dorsal e mantido em mesa operatória, própria para contenção e abertura da boca do animal. Todo o procedimento de instalação do dispositivo foi realizado com auxílio de um microscópio cirúrgico DF Vasconcellos.

Com o auxílio de uma pinça *mathieu*, o fio de amarrilho, fixado em uma das extremidades da mola, era adaptado na região cervical do primeiro molar superior esquerdo, passado pela ameia distal e trançado ao redor do dente, depois

de cortado o excesso de fio, a ponta era dobrada e fixada com resina fotopolimerizável Transbond™ XT (3M Unitek, São Paulo, SP, Brasil), de modo a não se causar trauma ou desconforto para o animal. A extremidade mesial do fio era tracionada na direção dos incisivos, o fio de amarelo era trançado ao redor dos incisivos e, também, fixado com a resina fotopolimerizável Transbond™ XT (3M Unitek, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 4.3). A força aferida era de 10g.

Para a fixação com resina, era realizado condicionamento do esmalte dos dentes referidos, com ácido fosfórico em gel a 37% por 15 segundos, posteriormente removido com bolinhas de algodão embebidas em soro fisiológico, após a secagem do esmalte, era aplicado, com *microbrush*, uma camada de adesivo Transbond™ XT (3M Unitek, São Paulo, SP, Brasil) e fotopolimerizada por 20s.

Após a ativação inicial, o aparelho não recebeu nenhuma ativação adicional durante o período experimental, no entanto, seu posicionamento foi conferido semanalmente. O 1º molar inferior esquerdo foi extraído, para que não ocorresse interferência oclusal, devido a colocação de resina composta no 1º molar superior esquerdo. Os incisivos inferiores foram desgastados com um disco de lixa diamantados liso (Coralident, Vila Prudente, SP, Brasil) montada numa peça reta (Kavo®, Brasil) adaptada ao motor elétrico BML 600 (Driller, Jaguaré, SP, Brasil), para evitar possíveis interferências oclusais e/ou danos ao dispositivo instalado durante o experimento.

Finalizada a montagem do sistema de forças ortodônticas, era procedida a lavagem dos olhos dos animais com soro fisiológico. Esse procedimento é recomendado para se evitar o ressecamento da região ocular, uma vez que sob a ação dos anestésicos, os animais ficam com os olhos abertos durante o procedimento.

Figura 4.2 – Sequência da montagem do dispositivo ortodôntico. A) Exposição do 1º molar superior esquerdo; B) Fio de amarrilho na cervical do 1º molar superior esquerdo; C) Mola helicoidal amarrada ao amarrilho; D) Extremidade do fio de amarrilho trançada ao redor dos incisivos, após a aplicação do adesivo; E) Fotopolimerização da resina composta no incisivo superior; F) Dobra do amarrilho para não causar trauma ou desconforto para o animal; G) Ácido fosfórico em gel a 37% no molar superior esquerdo; H) Resina composta no incisivo e no molar e incisivos inferiores desgastados

4.3 Aplicação do LED

Foi utilizado nesta pesquisa o aparelho LED (protótipo), com emissão de radiação infravermelha. Todos os parâmetros utilizados estão listados na Tabela 4.1.

Equipamento	LED infravermelho
Comprimento de onda	850 nm
Potência	30mW
Tempo de aplicação por ponto	5 minutos
Sessões	1 diária (5 dias consecutivos)

Sabe-se que a irradiação infravermelha de 750nm apresenta uma penetração, nos tecidos moles, maior que a irradiação de 650nm. Sendo o objetivo do presente estudo estimular as células ósseas que estão sob o tecido mole no espaço periodontal, o LED infravermelho (850nm) foi selecionado para este trabalho.

Em cada sessão foram realizadas as aplicações via extrabucal, com tricotomia prévia (figura 4.4) devido à impossibilidade de se distender amplamente a mucosa jugal do animal, a fim de se obter o perpendicularismo no interior da cavidade bucal, e por conta disso, a dose de energia foi aumentada em 20%. Todas as irradiações foram realizadas pelo mesmo operador e ocorreram nos primeiros 5 dias após a colocação do dispositivo.

Figura 4.3 – Aplicação extrabucal da luz LED (tricotomia prévia)

4.4 Condições Ambientais

Durante o período experimental os animais permaneceram no Biotério de Experimentação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, e foram mantidos em gaiolas coletivas, contendo no máximo três animais cada, com temperatura entre 21°C e 23°C, considerada ideal para o crescimento e desenvolvimento dos animais, e iluminação dia e noite. Cada gaiola era forrada com raspas de madeira (maravalha), que eram substituídas a cada 48hs, propiciando assim, condições favoráveis de higiene e preenchendo os requisitos físico-químicos para a saúde e bem-estar dos animais (FINEP, 1996).

A alimentação consistiu de ração apropriada (Labina, Purina®, França) e água *ad libitum*. Iniciado o experimento a ração era oferecida em pó, para evitar danos ao dispositivo ortodôntico durante a mastigação. Os animais foram pesados no dia da colocação do dispositivo e no dia da eutanásia, para verificar quaisquer alterações de peso relacionadas à alimentação e/ou condições experimentais.

4.5 Quantificação da movimentação dentária com μ TC

Foram selecionados aleatoriamente, para avaliar a quantidade de movimento dentário, 5 animais do GCON 21 dias e 5 animais do GLED 21 dias de movimentação.

Para a realização da análise microtomográfica foi utilizado um equipamento SkyScan 1176 *in vivo* (SKYSCAN N.V, Kontich, Belgium). Os animais eram anestesiados e levados até o microtomógrafo; colocados em decúbito ventral em um suporte para ratos. O escaneamento foi padronizado com um tamanho de voxel isotrópico de 18 μ m, 70kV, 355 μ A, em 360°, ângulo de rotação de 0,50 e filtro de Al de 1mm. As imagens do crânio de cada rato foram reconstruídas com o software específico NRecon® v.1.6.3.3.

As μ TC foram realizadas uma vez por semana, sendo a primeira microtomografia realizada no dia da colocação da mola no primeiro molar superior, totalizando 4 sessões (Figura 4.5).

Figura 4.5 – Reconstrução 3D das imagens obtidas no SkyScan 1176. Vista oclusal. Acompanhamento da movimentação dentária nos seguintes períodos: A) Início da movimentação; B) 7 dias após o início do experimento; C) 14 dias depois da colocação da mola; D) 21 dias de movimentação dentária

Os softwares CTAN® v.1.10.11.0 e CTVOX® v.2.00.0 foram utilizados para a visualização tridimensional e análise quantitativa. No programa CTAN®, uma imagem em 2D era escolhida, nesta imagem dois pontos eram determinados, a ponta de cúspide distovestibular do primeiro molar superior e a ponta de cúspide mesiovestibular do segundo molar superior: uma reta era traçada entre esses dois pontos, e o valor dessa distância era automaticamente fornecido pelo programa (Figura 4.6). Essa mensuração foi realizada por um único operador, previamente calibrado. Foram feitas 5 medidas, entre os dois pontos estabelecidos, e os dois valores (o maior e o menor) eram descartados, e então feita uma média aritmética com os três valores restantes. Essa medida era representativa para cada animal. Após todas as medidas realizadas em cada período desejado (0, 7, 14 e 21 dias) essas medidas foram organizadas em tabelas e analisadas estatisticamente (tabela 4.2 e tabela 4.3) O teste estatístico escolhido foi o teste t student. Os dados também foram representados em gráfico (gráficos 5.1).

Figura 4.6 – Reconstrução 2D das imagens obtidas no SkyScan 1176. Vista lateral. A) No dia da colocação da mola; B) 7 dias após a instalação do dispositivo; C) 14 dias do início do experimento; e D) 21 dias de movimentação.

4.6 Processamento do material

4.6.1 Obtenção dos espécimes e fixação

No dia da eutanásia os animais foram anestesiados por via intramuscular com uma combinação de ketamina e xilazina, sendo a dose de 0,1 mL de cada solução para 100 g de massa corporal. Em seguida, foram eutanasiados por decapitação e tiveram os processos alveolares da maxila removidos e prontamente imersos em solução fixadora (0,1% glutaraldeído + 4% formaldeído em tampão fosfato 0,1M pH7,2). O béquer contendo os espécimes imersos na solução fixadora foi posicionado no interior de um forno de micro-ondas Pelco 3440 (Ted Pella, Redding, CA. USA). Um termômetro era imerso na solução fixadora durante a operação do forno de micro-ondas a fim de monitorar a temperatura da mesma, a qual não ultrapassava 37°C. Os espécimes foram expostos a 3 ciclos de 5 minutos

cada, 100% de potência; Ao final da irradiação micro-ondas, esses eram imersos em nova solução fixadora *overnight* a 4°C (Massa; Arana-Chavez, 2000).

Após a fixação, os espécimes foram lavados durante uma hora em tampão fosfato a 0,05M pH7,4 e, em seguida, foram imersos em solução de EDTA a 4,13%, pH 7,2, onde permaneceram por aproximadamente 30 dias para descalcificação (Warshawsky; Moore, 1967). Após descalcificadas, as hemimaxilas foram separadas ao meio no sentido longitudinal e seguiram para processamento de inclusão em parafina (análise histológica e histoquímica).

4.6.2 Hematoxilina e Eosina (H&E)

Os espécimes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol, infiltrados e incluídos em parafina. Cortes de 4µm feitos no micrótomo Microm HM 360 e posteriormente corados em H&E para análise histológica. As imagens foram obtidas em um microscópio Olympus BX-60 equipado com sistema de captura de imagem Cell F.

4.6.3 Método histoquímico TRAP

Foram analisados através do método histoquímico TRAP (Tartrate resistant acid phosphatase) os espécimes tratados com LED (GLED) e sem LED (GCON), com 04, 07, 14, 21 dias de movimentação ortodôntica, com o objetivo de identificar células clásticas e seus precursores. Cortes de 4 µm foram desparafinizados em 2 banhos de xilol por 30 minutos e hidratados em concentrações decrescentes de etanol. Em seguida foram incubados no meio de Burstone, que foi preparado dissolvendo-se 4mg de “naphotol AS-BI phosphatesubstrate” em 0,25 ml de N,N-dimetil-formamida, seguido de adição de 25mL de tampão acetato 0,2M pH5,0 , 35mg de Fast Red Violt LB e 60 µL de MgCl a 10%. A solução era filtrada e aquecida a 37°C durante 5 minutos e, em seguida, era adicionado o ácido tartárico D(-) a uma concentração final de 50mM. Os cortes foram incubados a 37°C durante 1 hora e 30 minutos e, em seguida, lavados durante 30 minutos em água corrente e contra-corados com solução alcoólica de

Hematoxilina de Harris a 3% por 3 minutos. Após a contra-coloração, foi realizada a desidratação dos cortes em concentrações crescentes de etanol, seguida de etanol/xilol e diafanização em xilol. Todas as lâminas, contendo os cortes, foram montadas utilizando-se como meio o Entellan (Merck, White house Station, NJ, USA), examinadas e fotografadas em microscópio Olympus BX60.

5 RESULTADOS

5.1 Quantidade de movimento durante o período experimental

Os dados foram normalmente distribuídos (Student's *t* test). A tabela 5.1 mostra os dados das medidas centrais e de dispersão (em milímetros) da distância entre os pontos de referência ponta de cúspide distovestibular do primeiro molar superior esquerdo e a ponta de cúspide mesiovestibular do segundo molar superior esquerdo em ambos os grupos nos dias 0, 7, 14 e 21 após a instalação da mola. A tabela 5.2 mostra a variação das distâncias entre os dois pontos em relação ao intervalo de tempo. A quantidade de movimento foi maior no grupo experimental em T1.

Tabela 5.1 – Medidas de tendência central e de dispersão, quantidade de movimentação

Tempo (dias)	Grupo (n=10)	média (mm)	desvio-padrão
0	Controle LED	0,8782 0,7936	0,0893 0,0813
7	Controle LED	0,930 0,928	0,142 0,140
14	Controle LED	1,157 1,096	0,086 0,117
21	Controle LED	1,059 1,213	0,099 0,201

Tabela 5.2 – Quantidade de movimentação dentária – 21 dias

Intervalo de Tempo	GCON (n=5) média(mm)	GLED (n=5) média (mm)	<i>p</i> ^a
T1	0,0632	0,1693	0,2285
T2	0,2271	0,1523	0,5215
T3	-0,1358	0,1162	0,1250

T1 (intervalo entre 0 – 7 dias); T2 (intervalo entre 7- 14 dias); e T3 (intervalo entre 14 – 21 dias);

^a Teste *t* Student

Com relação a quantidade de movimentação dentária, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e LED nos intervalos T1, T2 e T3. Embora no intervalo T1 e T3 a quantidade de movimento foi maior no grupo LED comparado ao grupo controle. Já no intervalo T2 a quantidade de movimentação foi maior no grupo controle. Após o T2 a taxa de movimentação decresce em ambos os grupos (Gráfico 5.1). Cabe destacar que o movimento foi mais constante no GLED.

Gráfico 5.1 - Quantidade de movimento durante o período experimental (21 dias)

5.2 Avaliação histológica e histoquímica TRAP

Os cortes histológicos mostraram as raízes mesiovestibular e distovestibular no sentido longitudinal (Figuras 5.1A; 5.2A; 5.3A; 5.5A; 5.8A). Mas devido à diferença do calibre das raízes, a distribuição das tensões no ligamento periodontal resultantes da força ortodôntica de 10 gramas aplicada é maior na raiz distovestibular. Sendo assim, a raiz distovestibular foi escolhida para ilustrar as alterações histológicas.

Grupo Controle - 4 dias

Nos cortes histológicos de todos os animais desse grupo observou-se infiltrado inflamatório na papila interdentária, entre o 1º molar superior e o 2º molar superior, decorrente a presença do fio de aço. Além do processo inflamatório, foi possível observar reabsorção da crista óssea alveolar, caracterizada pela presença de osteoclastos multinucleados na superfície óssea (Figura 5.1B). Examinando a área interradicular, na face mesial da raiz distovestibular, zona de pressão, as fibras colágenas estavam desorganizadas, havia hialinização ocupando todo o espaço periodontal (Figura 5.1C).

Na zona de tração, face distal da raiz distovestibular, as fibras colágenas estavam distendidas e em toda a extensão dessa face, no osso alveolar foi possível verificar reabsorção óssea, com a presença de lacunas de Howship e alguns osteoclastos (Figura 5.1D), que foram evidenciadas pelo método TRAP (Figura 5.1E;F) Na superfície da raiz, em ambas as faces, não havia atividade osteoclástica evidente.

Grupo Experimental – 4 dias

Nos cortes histológicos das amostras desse grupo, também, verificou-se a presença de infiltrado inflamatório na papila interdentária, entre o 1º molar superior e o 2º molar superior, decorrente da presença do fio de aço. Também, foi possível observar uma reabsorção da crista óssea alveolar, caracterizada pela presença de osteoclastos multinucleados, e lacunas de reabsorção (Figura 5.2B)

As fibras colágenas, da região intrarradicular, estavam desorganizadas, verificou-se extensa área de hialinização (Figura 5.2C). Nessa área, notou-se reabsorção óssea, com a presença de lacunas de reabsorção, e as células clásticas multinucleadas estavam presentes em maior número quando comparadas ao GCON4d (Figura 5.2 E; F). Na face distal da raiz distovestibular, havia tração das fibras colágenas, a superfície do osso alveolar estava irregular, demonstrando a atividade reabsortiva (Figura 5.2D).

GCON – 4 dias

Figura 5.1 – Fotomicrografias dos animais experimentais do grupo controle 4 dias. A- Visão geral do 1º molar superior esquerdo; B- Visão geral da papila interdentária - inflamação; C- Área de hialinização (*) na face mesial da raiz distovestibular, que recebeu pressão durante a movimentação ortodôntica; D- Face distal da raiz distovestibular, área de tração durante a aplicação da força ortodôntica; E – Visualização da área de tração, na face externa da raiz distovestibular, osteoclastos (Oc) TRAP-positivos na superfície do osso alveolar; F- Visualização da área de tração na face externa da raiz distovestibular em maior aumento.

GLED – 4 dias

Figura 5.2 – Fotomicrografias dos animais experimentais do grupo LED 4 dias. A- Visão geral do 1ºmolar superior esquerdo; B- Visão geral da raiz distovestibular do 1ºmolar superior esquerdo; C- Área de hialinização (*) na face mesial da raiz distovestibular, que recebeu pressão durante a movimentação ortodôntica; D- Face distal da raiz distovestibular, área de tração durante a aplicação da força ortodôntica; E – Visualização da área de tração, na face distal da raiz distovestibular, osteoclastos (Oc) TRAP-positivos na superfície do osso alveolar; F- Visualização da área de tração na face distal da raiz distovestibular em maior aumento.

Grupo Controle – 7 dias

O infiltrado inflamatório na papila interdentária entre o 1º molar superior e o 2º molar superior continuou presente, assim como a reabsorção da crista óssea alveolar, com a presença de osteoclastos multinucleados (Figura 5.3 B). Foi possível verificar reabsorção da raiz distovestibular na face distal (Figura 5.3 D). Extensa reabsorção no ápice da raiz, na superfície do cimento, estava presente (Figura 5.3C; E). Próximo a região da furca, na face mesial da raiz distovestibular, zona de pressão, o espaço periodontal estava reduzido, e verificou-se extensa área de hialinização (Figura 5.3C). No osso alveolar interradicular, células clásticas multinucleadas estavam presentes, e havia osteoclastos na superfície da dentina (Figura 5.3F).

Grupo Experimental – 7 dias

O infiltrado inflamatório na papila interdentária entre o 1º molar superior e o 2º molar inferior permanecia presente, assim como a reabsorção da crista óssea alveolar, com a presença de osteoclastos multinucleados (Figura 5.4F). Reabsorção radicular da raiz distovestibular não foi observada (Figura 5.4C; D), entretanto na região de pressão, foi possível verificar muitos osteoclastos (Figura 5.4 E), no osso alveolar interradicular. (Figura 5.4E). Áreas de hialinização não foram observadas no ligamento periodontal (Figura 5.4C).

GCON - 7 dias

Figura 5.3 – Fotomicrografias dos animais experimentais do grupo controle 7 dias. A- Visão geral do 1º molar superior esquerdo; B- Área da papila interdentária, células TRAP- positivas; C- Área de hialinização (*) na face mesial da raiz distovestibular, que recebeu pressão durante a movimentação ortodôntica; D- Face distal da raiz distovestibular, área de tração durante a aplicação da força ortodôntica; E – Reabsorção no cimento da região apical da raiz distovestibular; F- Visualização da área intrarradicular com a presença de osteoclastos (Oc)

GLED – 7 dias

Figura 5.4 – Fotomicrografias dos animais experimentais do grupo LED 7 dias. A- Visão geral do 1º molar superior esquerdo; B- Visão geral da papila interdentária; C- Área de pressão durante a movimentação ortodôntica; D- Face distal da raiz distovestibular, área de tração durante a aplicação da força ortodôntica; E – Visualização da área intrarradicular de tração, osteoclastos (Oc) TRAP-positivos na superfície do osso alveolar; F- Visualização do trabeculado ósseo com atividade reabsortiva.

Grupo Controle - 14 dias

Discreto infiltrado inflamatório na papila interdentária entre o 1º molar superior e o 2º molar superior, assim como a reabsorção da crista óssea alveolar, sem a presença de osteoclastos multinucleados (Figura 5.5B). A reabsorção óssea ficou evidente na face distal da raiz distovestibular, com a presença de osteoclastos na superfície óssea, evidenciados pelo método histoquímico TRAP (Figura 5.5E;F).

Próximo à região da furca, na face mesial da raiz distovestibular, zona de pressão, o espaço periodontal estava reduzido, com presença de área de hialinização (Figura 5.5C).

Na face distal da raiz distovestibular foi possível observar reabsorção radicular (Figura 5.5D).

Grupo Experimental – 14 dias

Discreto infiltrado inflamatório na papila interdentária entre o 1º molar superior e o 2º molar superior, sem atividade reabsortiva da crista óssea alveolar, não havia osteoclastos multinucleados evidentes nesta área (Figura 5.6B).

Próximo à região da furca, na face mesial da raiz distovestibular, zona de pressão, o espaço periodontal estava reduzido, porém, sem a presença de área hialina (Figura 5.6C). Entretanto, observou-se uma extensa e profunda área de reabsorção na superfície radicular (Figura 5.6C), mas pouca atividade osteoclástica (Figura 5.6E).

O osso alveolar da parede mesial da raiz distovestibular apresentou áreas de reabsorção óssea (Figura 5.6D), com a presença de osteoclastos em sua superfície (Figura 5.6F).

GCON – 14 dias

Figura 5.5 – Fotomicrografias dos animais experimentais do grupo controle 14 dias. A- Visão geral do 1º molar superior esquerdo; B- Área da papila interdental; C- Área de hialinização (*) na face mesial da raiz distovestibular, que recebeu pressão durante a movimentação ortodôntica; D- Face distal da raiz distovestibular, área de tração durante a aplicação da força ortodôntica; E – Visualização da área de pressão, na face mesial da raiz distovestibular, osteoclastos (Oc) TRAP-positivos na superfície do osso alveolar; F- Visualização da área de pressão na face mesial da raiz distovestibular em maior aumento.

GLED – 14 dias

Figura 5.6 – Fotomicrografias dos animais experimentais do grupo LED 14 dias. A- Visão geral do 1º molar superior esquerdo; B- Vista da crista óssea alveolar (CA); C- Área de pressão durante a movimentação ortodôntica; D- Face distal da raiz distovestibular, área de tração durante a aplicação da força ortodôntica; E – Visualização da área de pressão na face mesial da raiz distovestibular, osteoclastos (Oc) TRAP-positivos na superfície da raiz e extensa reabsorção radicular; F- Visualização da área de tração na face distal da raiz distovestibular com osteoclastos presentes.

Grupo Controle – 21 dias

Ausência de infiltrado inflamatório na papila interdentária entre o 1ºmolar superior e o 2ºmolar superior, não havia atividade reabsortiva da crista óssea alveolar nem células clásticas nesta área (Figura 5.7B).

Próximo à região da furca, na face mesial da raiz distovestibular, zona de pressão, a largura do espaço periodontal estava restabelecida (Figura 5.7D), não havia área hialina e nem células clásticas no osso alveolar (Figura 5.7E;F), entretanto, observou-se uma extensa e profunda área de reabsorção na superfície radicular mas sem atividade osteoclástica (Figura 5.7E), Também foi possível verificar reabsorção no cimento do ápice da raiz (Figura 5.7C).

Grupo Experimental – 21 dias

Ausência de infiltrado inflamatório na papila interdentária entre o 1ºmolar superior e o 2ºmolar superior, porém havia atividade reabsortiva da crista óssea alveolar e células clásticas nesta área (Figura 5.8B;E;F).

Próximo à região da furca, na face mesial da raiz distovestibular, zona de pressão, a largura do espaço periodontal estava restabelecida (Figura 5.8 B;C), não havia presença de área hialina e nem células clásticas no osso alveolar (Figura 5.8C), entretanto, observou-se uma área de reabsorção na superfície radicular (Figura 5.8C), mas sem atividade osteoclástica.

O ligamento periodontal na face distal da raiz distovestibular apresentava reorganização das fibras colagénas, restabelecendo seu aspecto de normalidade (Figura 5.8D)

GCON – 21 dias

Figura 5.7 – Fotomicrografias dos animais experimentais do grupo controle 21 dias. A- Visão geral do 1º molar superior esquerdo; B- Visão geral da raiz distovestibular do 1º molar superior esquerdo; C- Área de pressão durante a movimentação ortodôntica; D- Face mesial da raiz distovestibular, área de pressão durante a aplicação da força ortodôntica; E – Visualização da área de pressão, na face mesial da raiz distovestibular, extensa área de reabsorção na raiz distovestibular; F- Visualização da área de pressão na face mesial da raiz distovestibular sem a presença de osteoclastos (Oc) TRAP-positivos

GLED – 21 dias

Figura 5.8 – Fotomicrografias dos animais experimentais do grupo LED 21 dias. A- Visão geral do 1º molar superior esquerdo; B- Visão geral da raiz distovestibular do 1º molar superior esquerdo e crista óssea alveolar (CA); C- Face distal raiz distovestibular demonstrando extensa área de reabsorção na superfície radicular; D- Face distal da raiz distovestibular, área de tração durante a aplicação da força ortodôntica; E – Visualização da área de tração, osso alveolar com osteoclastos (Oc) TRAP-positivos adjacentes a lacunas de Howship (LH); F- Visualização dos osteoclastos em maior aumento.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi empregada a microtomografia computadorizada *in vivo* para quantificar o deslocamento dentário, diferente dos estudos de Marquezan et al. (2010), Gama et al. (2010), Altan et al. (2012), Duan et al. (2012), Ekizer et al. (2015), Shirazi et al. (2015) que utilizaram o paquímetro para mensurar a distância entre dois pontos. O método de avaliação para medir a quantidade de movimento pode interferir nos resultados, o que deve ser levado cuidadosamente em consideração. O paquímetro, pode mascarar, diferença de medidas muito pequenas, principalmente nos estudos com força reduzida. Essa pesquisa empregou microtomografias com uma resolução de 18 μ m, o que permite uma maior confiança da medida entre os dois pontos próximos; entretanto, no presente trabalho nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos controle e grupo experimental, assim como nos trabalhos de Seifi et al. (2007), Marquezan et al. (2010), Gama et al. (2010), Altan et al. (2012), Duan et al. (2012), Marquezan et al. (2013), Seifi et al. (2014). Observando o comportamento do movimento dentário, a movimentação do GLED mostrou-se constante, quando comparado aos picos crescentes e decrescentes do GCON. Com isto pode-se afirmar que o movimento dentário foi melhor no GLED.

A maior contribuição que um estudo animal pode trazer para a ciência é a possibilidade de realizar um estudo microscópico dos tecidos, pois essa investigação não é possível em humanos. Em nosso estudo, esse objetivo foi atingido, explorando os cortes histológicos para avaliar o efeito do LED sobre os tecidos periodontais, durante a movimentação ortodôntica. Os cortes histológicos foram realizados no sentido longitudinal para investigar ao microscópio de luz todo o comprimento da raiz. Nesse sentido foi possível observar as alterações biológicas do ligamento periodontal, osso alveolar e das raízes mesiovestibular e distovestibular, nos diferentes pontos de pressão/tração durante a movimentação, nos diferentes períodos propostos.

A maioria das pesquisas, clínicas ou em animais experimentais, em ortodontia, que investigam o efeito da luz infravermelha durante a movimentação dentária, relacionam a aplicação do laser durante movimentação ortodôntica (Lim et

al., 1995; Kawasaki; Shimizu, 2000; Cruz et al., 2004; Limpanichkul et al., 2006; Turhani et al., 2006; Seifi et al., 2007; Youssef et al., 2008; Fujita et al., 2008; Tortamano et al., 2009; Yoshida et al., 2009; Abi-Ramia et al., 2010; Habib et al., 2010; Gama et al., 2010; Markezan et al., 2010; Yamaguchi et al., 2010; Sousa et al., 2011; Altan et al., 2012; Duan et al., 2012; Habib et al., 2012; Bicakci et al., 2012; Markezan et al., 2013; Cossetin et al., 2013; Genc et al., 2013; Domínguez; Velásquez 2013; Kansal et al., 2014; Seifi et al., 2014; Hevari et al., 2014; Shirazi et al., 2015; Domínguez et al., 2015). O LED é pouco investigado como fonte de energia luminosa para verificar sua influência durante o movimento ortodôntico. O LED, assim como o Laser, pode depositar energia sobre os tecidos, resultando em efeitos de fotobiomodulação, tendo como vantagem uma maior área de aplicação e custo reduzido(Fonseca et al., 2013).

Na literatura, não há um protocolo estabelecido para aplicação do Laser ou LED. Os trabalhos, em sua maioria, empregam o Laser GaAsAl, com diferentes doses de energia, o que dificulta a comparação entre as diversas investigações. Talvez, por isso, encontramos muitas controvérsias a respeito dos resultados entre os estudos. As investigações com LED também elegeram diferentes energias (Ekizer et al., 2015; Fonseca et al., 2013). O emprego de parâmetros distintos é decorrente da busca de uma dose ideal, para um efeito positivo da luz sob os tecidos envolvidos na movimentação ortodôntica.

Nesta investigação foi aplicada uma luz LED infravermelha durante 5 minutos por um período de 5 dias consecutivos em todos os animais do grupo experimental. Embora o procedimento de aplicação do LED, fosse rápido e não provocasse dor nos animais, foi necessário a aplicação de uma dose anestésica reduzida para não causar estresse aos animais durante a imobilização mecânica.

Assim como em todos os trabalhos em animais citados nesse estudo, elegemos apenas um lado para a aplicação da força ortodôntica e do LED, visando eliminar a possibilidade do efeito sistêmico. Portanto, os animais foram divididos em 2 diferentes grupos (experimental e controle). O grupo experimental recebeu uma força no 1ºmolar superior esquerdo e radiação LED na pele da bochecha do lado esquerdo, na direção dos molares; e o grupo controle recebeu apenas a mola no primeiro molar superior esquerdo.

A análise realizada, no presente experimento, nos dias 4, 7, 14 e 21 dias, visou observar a fase inicial, intermediária e tardia da movimentação. Poucos trabalhos avaliam a movimentação em ratos por um período superior a 14 dias (Yoshida et al., 2009; Gama et al., 2010; Ekizer et al., 2015), sendo necessário trabalhos que investiguem períodos mais tardios da movimentação.

Uma das alterações observadas neste estudo foi a necrose estéril, ou hialinização. A hialinização reduz a velocidade de movimentação dentária ou a impede (Consolaro et al., 2011), e precede à reabsorção radicular (Capelloza; Silva, 1998). Devido à hialinização ser um ponto importante e de relevância para a clínica ortodôntica, e ter sido dada pouca importância a esse aspecto, nosso estudo investigou essa reação tecidual. No dia 4, em ambos os grupos e a partir do dia 7 apenas no GCON, foi possível observar a necrose estéril no ligamento periodontal, na área de pressão da raiz distovestibular no terço médio, apontando uma diferença significativa da hialinização no GLED após 7 dias, o que vai contra os achados de Habibs et al. (2010), que investigaram esse aspecto e verificaram que no grupo tratado com Laser, houve uma redução significativa da hialinização após 19 dias de experimento.

Outro ponto importante para o ortodontista é a reabsorção radicular. Todo tratamento ortodôntico resulta em algum tipo de reabsorção radicular, sendo um efeito indesejável e inevitável do tratamento ortodôntico (Nimeri et al., 2014). No presente estudo verificou-se pequenas áreas de reabsorção, na área de pressão sob superfície da raiz, a partir do dia 7 em ambos os grupos (GCON e GLED), entretanto no GLED, a partir do dia 14, a reabsorção foi bem extensa na área de pressão, sugerindo que houve maior reabsorção com a aplicação do LED. Estes achados são diferentes dos resultados de Ekizer et al. (2013), que observou uma inibição da reabsorção radicular estatisticamente significativa no grupo irradiado.

A reabsorção está relacionada à ativação de células clásticas. O aumento do número de células multinucleadas pode estar associado ao efeito da luz, que é capaz de estimular ou inibir atividades enzimáticas e fotoquímicas nos tecidos vivos, dependendo da dose aplicada (Habib et al., 2010).

É necessária a ativação das células clásticas, pela fusão dos receptores RANK-RANKL, para que ocorra a reabsorção radicular. No presente estudo com LED ($E=45J$) foi avaliada a presença de osteoclastos no periodonto de suporte, e foi observada a presença dessas células multinucleadas identificadas pelo método histoquímico TRAP no ligamento periodontal, na área de pressão, e no osso alveolar, em maior número dos grupos de 4 e 7 dias e mais evidenciados no GLED, discordando do estudo de Fonseca et al.(2013), que afirma uma diminuição de células clásticas no grupo com aplicação de LED ($E=3,99J$).Fujita et al. (2008), empregando Laser e LED, observaram um aumento significativo dos receptores RANK e RANKL no grupo irradiado com laser.

Para que ocorra uma movimentação do dente no interior do alvéolo, deve haver uma remodelação óssea. Para ocorrer a remodelação, no lado da pressão, há uma diminuição do espaço periodontal e essa região necessita restabelecer esse espaço do ligamento periodontal. O nosso estudo aponta uma intensa reabsorção óssea na área de pressão, com a presença de lacunas de reabsorção, principalmente nos tempos de 4 e 7 dias. Sendo notável uma reabsorção frontal na face mesial da raiz distovestibular, principalmente no grupo experimental, assim como no trabalho de Cossetin et al. (2013), que observou maior reabsorção óssea no grupo experimental em 7 dias de movimentação.

Assim, a diferença no padrão de movimentação dentária entre os grupos, encontrado no nosso estudo, pode ser explicada pela diferença de reabsorção óssea da parede alveolar justaposta à face mesial da raiz distovestibular. No dia 07, no GLED, não houve hialinização na face de pressão, favorecendo uma maior movimentação. Já no dia 14, a avaliação histoquímica revela um grande número de células clásticas TRAP-positivas no trabeculado ósseo na região da hialinização, na face mesial da raiz distovestibular no GCON demonstrando maior atividade reabsortiva e por isso uma maior taxa de movimentação em T2 nesse grupo. E no dia 21, no GCON, não há presença de células multinucleadas no trabeculado ósseo, reduzindo a taxa de movimentação.

Um aspecto observado no presente estudo, e que não foi abordado nos demais estudos, é a inflamação na região da papila interdentária entre o 1º molar e o 2º molar superiores, decorrente da colocação do fio de aço na cervical do 1ºmolar.

Essa presença do processo inflamatório não foi objetivo no nosso trabalho, mas permitiu o acompanhamento do infiltrado inflamatório nos 4 tempos distintos e sua comparação entre os grupos controle e experimental. No decorrer dos períodos a inflamação reduziu, em ambos os grupos, entretanto os grupos com a aplicação do LED apresentaram maior reabsorção da crista óssea alveolar, provavelmente pela presença de maior número de células multinucleadas segundo a avaliação descritiva.

São poucos os estudos que empregam o LED como fonte de luz, o que impede comparações entre as investigações e conclusões mais assertivas. Assim, são necessários estudos utilizando o LED como terapia luminosa, o que nos incentiva a realizar futuras investigações.

7 CONCLUSÃO

A partir das análises obtidas, foi possível concluir que a aplicação do LED, nos parâmetros empregados neste estudo, reduz a hialinização a partir do dia 07, porém, aumenta as células clásticas em todos os tempos de observação (4, 7, 14, e 21 dias) e uma maior reabsorção radicular.

A fototerapia LED não promoveu, conforme avaliação de microtomografias computadorizadas, a aceleração da movimentação dentária.

REFERÊNCIAS¹

Abi-Ramia LBP, Stuari AS, Stuari AS, Stuari MBS, Mendes AM. Effects of low-level Laser therapy and orthodontic tooth movement on dental pulps in rats. *Angle Orthod.* 2010; 80(01):116-22

Altan BA, Sokucu O, Ozkut MM, Inan S. Metrical and histological investigations of the effects of low-level laser therapy on orthodontic tooth movement. *Lasers Med Sci.* 2012; 27:131-40.

Arana-Chavez VE, Bradaschia-Correa V. Clastic cells: Mineralized tissue resorption in health and disease. *Int J BiochemCell Biol.* 2009; 41: 446-50.

Araújo KS. Efeito da terapia com LED operando em baixa potência sobre a reparação óssea de ratos – análise por espectroscopia Raman. [dissertação]São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2009.

Barros FC, Antunes AS, Figueredo CMS, Fischer RG. Laser de baixa intensidade na cicatrização periodontal. *Rev Ci Med Biol.* 2008; 7:85-9.

Bicakci AA, Kocoglu-Altan B, Toker H, Mutaf I, Sumer Z. Efficiency of low-level laser therapy in reducing pain induced by orthodontic forces. *Photomed Laser Surg.* 2012; 30:460-5.

Brawn PR, Kwong-Hing A. Histologic comparison of light emitting diode phototherapy-treated hydroxyapatite-grafted extraction sockets: a same-mouth case study. *Implant Dent.* 2007; 16(2): 204-11.

Capelozza-Filho L, Silva-Filho OG. Reabsorção radicular na clínica ortodôntica: atitudes para uma conduta preventiva. *Rev D Press Ortod Ortop Fac.* 1998; 3(1): 104-26.

Casalechi HL, Nicolau RA, Casalechi VL. The effects of low- level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. *Lasers Med Sci.* 2009 Jul; 24(4):659-65.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver

Consolaro, A. Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. 2ªed. Maringá: Dental Press; 2005.

Consolaro A, Cardoso LB, Kinoshita AMO, Francischone LA, Santamaria Jr M, Fracalossi ACC, Maldonado VB. Reabsorção óssea à distância na movimentação ortodôntica: quando se inicia e como ocorre a reorganização periodontal. D Press J Orthod. 2011; 16(3): 25-31.

Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. Photomed Laser Surg. 2007; 25(2):102-6.

Cossetin E, Janson G, Carvalho MGF, Carvalho RA, Henriques JFC, Garib D. Influence of low-level laser on bone remodeling during induced tooth movement in rats. Angle Orthod. 2013; 83(6): 1015-21.

Cruz DR. Effects of low-intensity laser therapy on the orthodontic movement velocity of human teeth: a preliminary study. Lasers Surg Med. 2004; 35:117-20.

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

Desmet KD, Paz DA, Corry JJ. Clinical and Experimental Applications of NIR- LED Photobiomodulation. Photomed Laser Surg. 2006; 24(2):121- 8.

Domínguez A, Vélasquez SA. Effect of low-level laser therapy on pain following activation of orthodontic final arch wires: a randomized controlled clinical trial. Photomed Lasers Surg. 2013; 31: 36-40.

Domínguez A, Gómez C, Palam JC. Effects of low-level laser therapy on orthodontics: rate of tooth movement, pain, and release of RANKL and OPG in GCF. Lasers Med Sci. 2015; 30: 915-23.

Duan J, Na Y, Liu Y, Zhang Y. Effects of the pulse frequency of low-level laser therapy on the tooth movement speed of rat molars. Photomed Laser Surg. 2012; 30: 663-67.

Ekizer A, Uysal T, Güray E, Akkus D. Effect of LED-mediated photobiomodulation therapy on orthodontic tooth movement and root resorption in rats. Lasers Med Sci. 2015; 30: 779-85.

Enwemeka CS. The Place of Coherence in Light Induced Tissue Repair and Pain Modulation. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24(4): 457-457.

Esper MALR, Nicolau RA, Arisawa EALS. The effect of two phototherapy protocols on pain control in orthodontic procedure - a preliminary clinical study. *Lasers Med Sci.* 2011; 26: 657-63.

Filho CT. Avaliação Biomecânica da Ação da radiação laser em baixa intensidade no processo de osseointegração de implantes de titânio inseridos em tibia de coelhos [dissertação: mestrado] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia. 2003.

FINEP. Manual para técnicos em bioterismo. São Paulo: H A Rotschild; 1996. p. 157-64

Fonseca PD'A, Lima FM, Higashi DT, Koyama DFV, Toguinho-Filho DO, Dias IFL, Ramos SP. Effects of light emitting diode (LED) therapy at 940 nm on inflammatory root resorption in rats. *Lasers Med Sci.* 2013; 28: 49-55.

Fracalossi ACC, Santamaria-Jr M, Consolaro MFMO, Consolaro A. Movimentação dentária experimental em murinos: período de observação e plano dos cortes microscópicos. *Rev Dental Press Ortodon Ortop Facial.* 2009 Jan/Fev; 14(1): 143-57.

Fujita S, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Low-energy laser stimulates tooth movement velocity via expression of RANK and RANKL. *Orthod Craniofac Res.* 2008; 11: 143-55.

Gama SKC, Habib FAL, Monteiro JSC, Paraguassú GM, Araújo TM, Cangussú MCT, Pinheiro AL. Tooth movement after infrared laser phototherapy: Clinical study in rodents. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(S.2): 79-83.

Genc G, Kocadereli I, Tasar F, Kilinc K, El S, Sarkarati B. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on orthodontic tooth movement. *Lasers Med Sci.* 2013; 28:41-7.

Habib FAL, Gama SKC, Ramalho LMP, Cangussú MC, Santos-Neto FP, Lacerda JA, Araújo TM, Pinheiro ALB. Laser-induced alveolar bone changes during orthodontic movement: a histological study on rodents. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28: 823-30.

Habib FAL; Gama SKC; Ramalho LMP; Cangussú MC; Neto FPS; Lacerda JA; Araújo TM; Pinheiro AL. Effect of laser phototherapy on the hyalinization following orthodontic tooth movement in rats. *Photomed Laser Surg.* 2012; 30: 179-85.

Heller IJ, Nanda R. Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement an experimental study. *Am J Orthod*.1979;3: 239-58.

Hevari F, Moradi A, Ahrari F. The effect of low level laser therapy on the rate of tooth movement and pain perception during canine retraction. *Oral Health Dent Manag*. 2014; 13(2): 183-8.

Huang PJ, Huang YC, Su MF. In Vitro Observations on the Influence of Copper Peptide Aids for the LED Photoirradiation of Fibroblast Collagen Synthesis. *Photomed Laser Surg*. 2007; 25(3):183-90.

Kansal A, Kittur N, Kumbhojkar V, Keluskar KM, Dahiva P. Effects of low-intensity laser therapy on the rate of orthodontic tooth movement: a clinical trial. *Dent Res J (Isfahan)*. 2014; 11(4): 481-8.

Karu TI. Laser Bioestimulation: a Photobiological phenomenon. *J. Photochem. Photobiol Biol*. 1989; 3: 638-40.

Kawasaki K, Shimizu N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Laser Surg Med*. 2000; 26(3): 282-91.

Lim HM, Lew KKK, Tay DKL. A clinical investigation of the efficacy of low level laser therapy in reducing orthodontic postadjustment pain. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1995; 108(6): 614-22.

Limpanichkul W, Godfrey K, Srisuk N, Rattanayatikul C. Effects of low-level laser therapy on the rate of orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res*. 2006; 9(1): 38-43.

Macapanpan LC, Weinmann JP, Brodie AG. Early tissue changes following tooth movement in rats. *Angle Orthod*. 1954; 24: 79-95.

Marquezan M, Bolognese AM, Araújo MTS. Evaluation of two protocols for low-level laser applications in patients submitted to orthodontic treatment. *Dental Press J Orthod*.2013; 18(1):33e1- 9.

Marquezan M, Bolognese AM, Araújo MTS. Effects of two low-intensity therapy protocols on experimental tooth movement. *Photomed Laser Surg*. 2010; 28(06): 757-62.

Martins-Ortiz M F. Influência dos bisfosfonatos na movimentação dentária induzida, na frequência e nas dimensões das reabsorções radiculares associadas [tese]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2004.

Massa LF, Arana-Chavez VE. Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiations. *Eur J Oral Sci.* 2000; 108(1):74-7.

Matsuzaka K, Ohta K, Takahashi K. Effect of a diode laser on cell proliferation, alkaline phosphatase activity, and osteopontin mRNA expression in proliferating and in differentiating osteoblastic cells. *Biomedic Res.* 2004; 25(4): 165-70.

Mavragani M, BrudvikP, Selvig KA. Orthodontically induced root and alveolar bone resorption: inhibitory effect of systemic doxycycline administration in rats. *Eur J Orthod.* 2005; 27: 215-25.

Millis DL, Francis D, Adamson C. Emerging Modalities in Veterinary Rehabilitation. *Vet Clin Small Anim.* 2005; 35(c.5): 1335–55.

Mikail S. Laser Terapêutico. c.11. In: PEDRO C.R.; MIKAIL S. *Fisioterapia Veterinária*. 2ed. São Paulo: Manole. 2009. p.89- 97.

Nimeri G, Kau CH, Corona R, Shelly J. The effect of photobiomodulation on root resorption during orthodontic treatment. *Clin Cosmet and Investig Dentist.* 2014; 6:1-8.

Pinheiro ALB, Gerbi MEMM. Photoengineering of Bone Repair Processes. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24(2): 169-78.

Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. The rat as model for orthodontic tooth movement - a critical review and a proposed solution. *Eur J Orthod.* 2004; 26: p.483-90.

Rubinov AN. Physical Mechanisms of biological effect of coherent and non coherent light. Available from: http://www.laser.nu/IIIt/IIIt_editorial_13.htm. 07 out de 2005.

Santamaria Jr M. Biologia da Movimentação dentária induzida e das reabsorções radiculares associadas – Influência do Gênero e dos bisfosfonato [Tese]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 2009.

Seifi M, Shafeei HA, Daneshdoost S, Mir M. Effects of two types of low-level laser wave lengths on the orthodontic tooth movements in rabbits. *Lasers Med Sci.* 2007; 22(4): 261-4.

Seifi M, Atri F, Yazdani MM. Effects of lo-level laser therapy on orthodontic tooth movement and root resorption after artificial sockets preservation. *Dent Research Journal* 2014; 11: 61-6.

Shirazi M, Akhoundi MSA, Javadi E, Kamali A, Motahhari P, Rashidpour M, Chiniforush N. The effects of diode laser (660nm) on the rate of tooth movements: an animal study. *Lasers MedSci.*2015; 30: 713-8.

Silva EM, Gomes SP, Ulbrich LM, Giovanini AF. Avaliação histológica da laserterapia de baixa intensidade na cicatrização de tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo: estudo experimental em ratos. *Rev Sul-Bras Odontol.* 2007; 4:29-35.

Sousa MVV, Scanavini MA, Sannomiya EK, Velasco LG, Angelieri F. Influence of low-level laser on the speed of orthodontic movement. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29: 191-6.

Smith KC. The Photobiological Basis of Low- Level Laser Radiation Therapy. *Laser Ther.* 1991; 3:19–24.

Stahl F, Ashworth SH, Klaus Jandt D. Light-emitting diode (LED) polymerization of dental composites: flexural properties and polymerization potential. *Biomaterials.* 2000; 2: 1379-85.

Tortamano A, Lenzi DC, Haddad ACSS, Bottino MC, Dominguez GC, Vigorito JW. Low-level laser therapy for pain caused by placement of first orthodontic archwire: a randomized clinical trial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009; 136: 663-7.

Turhani D, Scheriau M, Kapral D, Benesch T, Jonke E, Bantleon HP. Pain relief by single low-level irradiation in orthodontic patients undergoing fixed appliance therapy. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006; 130: 371-6.

Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2003; 18: 95–9.

Warshawsky H, Moore G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. *J Histochem Cytochem*. 1967; 15(9): 542-9.

Whelan HT, Smits-Jr RL, Buchman EV. Effect of NASA Light- Emitting Diode Irradiation on Wound Healing. *J Clinical Laser Med Surg*. 2001; 19(6): 305–14.

Yamaguchi M, Hayashi M, Fujita S, Yoshida T, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Low-energy laser irradiation facilitates the velocity of tooth movement and expressions of matrix metalloproteinase-9, cathepsin K, and $\alpha(v)\beta(3)$ integrin in rats. *Eur J Orthod*. 2010; 32:131-39.

Yoshida T, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Kato M, Arai Y, Kaneda T, Yamamoto H, Kasai K. Low-energy laser irradiation accelerates the velocity of tooth movement via stimulation of the alveolar bone remodeling. *Orthod Craniofac Res*. 2009; 12: 289-98.

Youssef M, Ashkar S, Hamade E, Gutknecht N, Lampert F, Mir M. The effect of low-intensity laser therapy during orthodontic movement: a preliminar study. *Lasers Med Sci*. 2008; 23(1): 27-33.

ANEXO – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Tel. (11) 3091 7887/7863

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **028/2013** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a). **Gladys Cristina Dominguez Morea** Coordenador(a) da Linha de Pesquisa **"Efeito do LED na movimentação dentária induzida em ratos"** do qual participam o(s) pesquisador(es) Victor Elias Arana-Chavez, Vivian Bradaschia Corrêa, Simone Peixe Friedrichsdorf e Elisangela Chinen, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **16/12/2013**, com validade de **03 (três)** anos.

São Paulo, 16 de dezembro de 2013.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Presidente do CEUA-FOUSP