AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA, IMUNOISTOQUÍMICA E MICROTOMOGRÁFICA
DA AÇÃO DA TERAPIA LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO PROCESSO DE REABSORÇÃO
RADICULAR DURANTE MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA INDUZIDA EM RATOS**

Selly Sayuri Suzuki

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro**

**São Paulo
2016**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA, IMUNOISTOQUÍMICA E MICROTOMOGRÁFICA
DA AÇÃO DA TERAPIA LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO PROCESSO DE REABSORÇÃO
RADICULAR DURANTE MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA INDUZIDA EM RATOS**

Selly Sayuri Suzuki

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro**

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2016

DEDICATÓRIA

A minha mãe Dirce, pelo apoio incondicional, ao meu irmão Rafael, minha fonte de inspiração e ao meu pai Hideo, pelo exemplo, suporte e incentivo todo os dias na busca pelo conhecimento.

Ao meu marido Aguinaldo e a minha filha Aline por estarem presentes ao meu lado em cada momento desta etapa, sempre me apoiando e incentivando. Nada disso teria sido possível sem vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha família pois, sem ela, esta conquista não seria possível e não teria sentido. Obrigada por vocês estarem sempre do meu lado, me ajudando e me apoiando em todos os dias da minha vida!

À minha orientadora, Profa. Martha, que me acolheu no seu laboratório (e na sua vida) sem hesitar, e me deu, além de ensinamentos e todo suporte necessário para a realização deste trabalho, seu carinho e amizade! Sou eternamente grata pela confiança.

Ao Prof. Edilson Ervolino, pela disponibilidade em me ensinar com paciência e me ajudar na realização dos ensaios inumoiestoquímicos deste trabalho. Agradeço também à todas as pessoas envolvidas no laboratório pelo auxílio nesta etapa.

Ao Prof. Won Moon, por me receber em seu laboratório na Universidade da Califórnia, Los Angeles, por alguns meses, tornando possível a realização de um sonho. Gostaria de agradecer suas orientações primordiais na condução das pesquisas envolvendo as imagens de microtomografias computadorizadas e também pelos ensinamentos ortodônticos com sua vasta experiência clínica.

A Profa. Elizabeth Ferreira Martinez pelo auxílio desde as fases iniciais deste projeto, sempre disposta a transmitir sua experiência na melhoria deste trabalho.

Ao Prof. Marcelo Napimoga pela gentileza e auxílio no ensaio Western Blotting.

Ao Prof. Lucas Novaes Teixeira pela prontidão em me ajudar e pelas sugestões valiosas na metodologia deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório de Patologia da Faculdade São Leopoldo Mandic, em especial para a Jerusa que não mediu esforços no auxílio no preparo histotécnico das peças e lâminas.

Aos professores da equipe SZK Ortodontia pela compreensão, apoio e amizade de sempre!

Aos meus colegas do CLA que se tornaram amigos ao longo do tempo, agradeço as

contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares por proporcionar infraestrutura adequada. Agradeço a todos os funcionários que me ajudaram direta ou indiretamente durante os experimentos.

Ao CLA e ao IPEN, agradeço pela infraestrutura fornecida e oportunidade dada a mim para realização deste estudo, e aos funcionários pela gentileza e disponibilidade em ajudar.

A CAPES, agradeço a bolsa para realização de Doutorado Sanduíche.

AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA, IMUNOISTOQUÍMICA E MICROTOMOGRÁFICA DA AÇÃO DA TERAPIA LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO PROCESSO DE REABSORÇÃO RADICULAR DURANTE MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA INDUZIDA EM RATOS

Selly Sayuri Suzuki

RESUMO

A movimentação dentária induzida é um processo biológico complexo mediado por estímulos mecânicos, levando a um subsequente processo de remodelação óssea, podendo haver reabsorção indesejada da raiz dentária provocada pelo excesso de força. Uma vez que a movimentação ortodôntica se baseia em um processo inflamatório localizado, o propósito deste estudo foi avaliar os efeitos do laser de baixa potência no processo de remodelação óssea e reabsorção radicular, buscando correlacionar as mudanças metabólicas observadas a nível celular ocorridas nos dias iniciais da movimentação dentária às alterações teciduais observadas microscopicamente e à arquitetura e morfologia do trabeculado e cortical ósseo. Primeiros molares de sessenta e oito ratos machos Wistar foram submetidos à movimentação induzida, divididos em 3 grupos: controle negativo (nenhuma movimentação), não irradiado (movimentação sem irradiação) e laser (movimentação e irradiação com laser de baixa potência de comprimento de onda de 810 nm, potência de 100 mW, área de 0,02cm² e energia de 1,5 J/ponto) e eutanasiados nos dias 3, 6, 9, 14 e 21. Mensurações da movimentação dentária e análises histomorfométricas foram realizadas em todos os dias estudados. Análise imunoistoquímica dos marcadores RANKL, OPG e TRAP e avaliações por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram feitas nos dias 3, 6 e 9 e o ensaio Western Blotting para proteínas RANKL e SOFAT e imagens de microtomografia computadorizada (MicroCT) nos dias 14 e 21. Os resultados deste estudo mostraram que a movimentação dentária foi significativamente maior no grupo Laser (aumento em média de 40%) em todos os dias avaliados. O lado de compressão mostrou maior expressão de RANKL e osteoclastos TRAP-positivos nos dias 3, 6 e 9 ($p<0,05$), promovendo significativa redução na área de osso alveolar presente no lado de compressão nos dias 6, 9 e 14 ($p<0,05$), e alterações microestruturais, como menor fração de volume ósseo/volume total, menor densidade óssea mineral aos 14 dias. A irradiação com laser também aumentou a expressão de RANKL e a citocina SOFAT no dia 14. No lado de tensão, houve maior expressão de OPG especialmente aos 9 dias ($p<0,001$) e significativo aumento na área de osso alveolar presente nos dias 14 ($p<0,01$) e 21 ($p<0,05$) histomorfometricamente e maior densidade óssea mineral e espessura das trabéculas aos 21 dias ($p<0,01$). Com relação às áreas de hialinização presentes, os resultados mostraram áreas significativamente reduzidas nos dias 3, 6 e 9 nos grupos irradiados, o que explica o menor número de odontoclastos na superfície radicular nestes dias e a redução significativa das áreas de reabsorção radicular observadas nas lâminas histológicas nos dias 9, 14 e 21 e nas imagens de MEV nos dias 3 e 9. Os grupos irradiados também mostraram menor volume das lacunas de reabsorção radicular medidas no MicroCT nos dias 14 e 21, especialmente nos lados de compressão. O estudo concluiu que o laser de baixa potência influenciou a remodelação óssea, aumentou a atividade dos osteoclastos no lado da compressão, e estimulou a formação óssea no de tensão, acelerando significativamente o movimento dentário e potencialmente reduzindo as áreas de necrose no ligamento periodontal e, conseqüentemente, a reabsorção radicular.

HISTOMORPHOMETRIC, IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND MICROTOMOGRAPHY EVALUATION OF THE EFFECT OF LOW LEVEL LASER THERAPY IN ROOT REABSORPTION PROCESS DURING ORTHODONTIC MOVEMENT INDUCED IN RATS

Selly Sayuri Suzuki

ABSTRACT

Tooth movement is a complex biological process induced by mechanical stimulation, leading to a subsequent process of bone remodeling, concomitantly unwanted root resorption may occur caused by excessive force. Since orthodontic movement is based on a localized inflammatory process, the purpose of this study was to evaluate the effects of low-level laser therapy on the process of bone remodeling and root resorption, searching to correlate metabolic changes observed at cellular level in the initial days of tooth movement to tissue changes observed microscopically and both architecture and morphology of trabecular and cortical bone. Upper first molars of sixty-eight male Wistar rats were submitted to induced movement, divided into 3 groups: negative control (no movement), non-irradiated (movement without irradiation) and Laser (movement and irradiation using low level laser of 810 nm wavelength, 100 mW power, 0.02cm² area, energy of 1.5J/point) and euthanized on days 3, 6, 9, 14 and 21. Measurements of tooth movement and histomorphometric analysis were performed at all days. Immunohistochemistry analysis of RANKL, OPG and TRAP markers and scanning electron microscopy (SEM) were made on days 3, 6 and 9. Western Blotting method to evaluate RANKL and SOFAT proteins and MicroCT images were performed on days 14 and 21. The results of this study showed that tooth movement was significantly greater in the irradiated side (increased in average of 40%) in all evaluated days. The compression side showed higher expression of RANKL and TRAP-positive osteoclasts on days 3, 6 and 9 ($p < 0.05$), promoting significant reduction in alveolar bone area in the compression side on days 6, 9 and 14 ($p < 0.05$), and leading to microstructural changes such as decrease of the fraction of bone volume / total volume (BV/TV) and the bone mineral density (BMD) at 14 days. The laser also increased RANKL expression and SOFAT on day 14. On the tension side there was an increased expression of OPG especially after 9 days ($p < 0.001$), a significant increase in alveolar bone area on days 14 ($p < 0.01$) and 21 ($p < 0.05$) histomorphometrically and increase in bone mineral density and trabecular thickness after 21 days ($p < 0.01$). Regarding hyalinized areas, the results showed significant reduced areas on days 3, 6 and 9 in irradiated groups, which explains the lower number of clastic cells on the root surface in these days, and a significant reduction of areas of root resorption observed in histology on days 9, 14 and 21 and on days 3 and 9 by SEM images. Irradiated groups also showed less volume of root resorption lacunae measured by MicroCT on days 14 and 21, especially in the compression side. The study concludes that the low-level laser therapy had an effect on bone remodeling, increasing osteoclast activity on the compression side, and stimulating bone formation in tension side, resulting in significant tooth movement acceleration and potentially reducing the areas of necrosis in the periodontal ligament and consequently the root resorption process.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVOS.....	10
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
3.1 Marcadores para a Movimentação Ortodôntica.....	11
3.2 Efeito do Laser de Baixa Potência na Movimentação Ortodôntica.....	19
3.3 Reabsorções Radiculares.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1. Delineamento Experimental.....	36
4.1 Animais.....	36
4.2 Movimento Dentário Experimental.....	37
4.3 Irradiação do Laser de Baixa Potência.....	37
4.4 Avaliação da Movimentação Dentária.....	38
4.5 Preparo Histotécnico das Peças para Avaliações Histológica e Imunoistoquímica.....	38
4.6 Ensaio Imunoenzimático Western Blot.....	41
4.7 Análise das Imagens de Microtomografia Computadorizada.....	43
4.8 Análise das Imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	45
4.9 Análise Estatística.....	46
5. RESULTADOS.....	47
6. DISCUSSÃO.....	77

CONCLUSÃO.....	93
REFERÊNCIAS.....	94
ANEXO 1: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	106
ANEXO 2: SUBMISSÃO DO ARTIGO NO JOURNAL OF BIOPHOTONICS.....	107

1. INTRODUÇÃO

A movimentação dentária induzida é um processo biológico complexo que promove reações dos tecidos periodontais de suporte (osso alveolar, ligamento periodontal, cemento e gengiva) em resposta às forças biomecânicas, levando a um subsequente processo de remodelação óssea. Um dos primeiros pesquisadores a estudar as alterações ósseas ocorridas durante a movimentação dentária foi Sandstedt, em um trabalho em cães, no início do século passado, que encontrou formação de novo osso depositado na parede alveolar posterior à direção de movimentação, ou seja, na área de tração do dente, utilizando-se de forças leves e pesadas. Na direção oposta, ou seja, no lado de compressão, com o uso de forças leves, o osso alveolar foi reabsorvido diretamente pelos numerosos osteoclastos diferenciados durante o processo e posicionados justapostos à superfície óssea. Diferentemente, com o uso de forças pesadas, os tecidos periodontais exageradamente comprimidos, levaram à trombose capilar, morte celular, e à produção de áreas livres de células, que ele denominou de área de hialinização (pela sua aparência semelhante à cartilagem hialina de cortes histológicos). Nesses locais, a reabsorção pelos osteoclastos na superfície óssea não ocorreu diretamente, sendo iniciada por um processo que foi referido como “reabsorção minante” ou reabsorção à distância (1).

Concomitantemente ao processo de reabsorção óssea induzido pela movimentação dentária, pode haver outro fenômeno de reabsorção, a reabsorção da raiz dentária. O excesso de força gera compressão dos vasos sanguíneos do ligamento periodontal e ausência de oxigênio no local, provocando a morte dos cementoblastos. Os cementoblastos são células que formam a camada cementoblástica, que reveste e protege a superfície radicular de reabsorções radiculares indesejadas. Para que ocorra a reabsorção radicular, previamente deve haver perda da camada cementoblástica. Mediante a isso, a superfície radicular fica desnuda, por morte das células que protegem a raiz dentária (cementoblastos) e exposta à ação das células clásticas que respondem aos mediadores da reabsorção atacando a superfície radicular (2).

A ocorrência de reabsorção radicular associada ao tratamento ortodôntico não é desejada e representa um fator de grande preocupação na ortodontia, pois corresponde a um dano tecidual/estrutural, acometendo cerca de 90,5% dos dentes permanentes tratados ortodonticamente, sendo a severa de 10 a 20% (3). A reabsorção radicular pode levar ao comprometimento do sucesso do tratamento ortodôntico, pois impede que movimentos

dentários mais amplos sejam realizados, pode reduzir a longevidade do dente e reduzir a capacidade de suportar forças mastigatórias, além de limitar seu uso como apoio em reabilitações protéticas, se necessário (4). Como possíveis fatores de risco da reabsorção radicular, podemos citar a influência da morfologia radicular e da crista óssea, a amplitude do movimento dentário, a magnitude da força aplicada, duração e tipo de tratamento ortodôntico, bem como idade e gênero do paciente (5,6). Pelo fato de corresponder a um fenômeno patológico, entender os mecanismos que participam do processo da movimentação dentária induzida e da reabsorção radicular tem levado a estudos direcionados a aumentar a quantidade de movimentação dentária e a reduzir a ocorrência de reabsorção radicular em nível celular e molecular (7–9).

Como o movimento dentário induzido pelo tratamento ortodôntico é considerado um processo inflamatório, muitos estudos têm sido conduzidos relacionando o efeito da administração de fármacos e outros estímulos, com objetivo de estimar a remodelação óssea, aumentar a quantidade de movimentação dentária, e prevenir o processo de reabsorção radicular. Dentre eles, incluem-se prostaglandinas (10), vitamina D (11), prostaciclina e tromboxane A2 (12), osteocalcina (13), fator kappa B (14), estímulo elétrico externo (15,16), hormônios como a tiroxina (17) e protocolos cirúrgicos como as corticotomias (18,19).

Por seu efeito biomodulador, o laser de baixa potência tem sido utilizado no campo da ortodontia, para redução da dor pós-ajuste do aparelho ortodôntico (20) e no tratamento de úlceras traumáticas promovidas pelo aparelho na mucosa oral (21). Uma vez que o tratamento ortodôntico se baseia em um efeito inflamatório localizado, induzido pela aplicação de forças biomecânicas no elemento dentário que se deseja movimentar, levando desta forma a uma remodelação óssea adjacente ao dente, o laser de baixa potência pode agir acelerando as trocas metabólicas e, desta forma, interferir no processo de reabsorção e neoformação óssea, o que pode proporcionar, na ortodontia, uma movimentação dentária induzida mais acelerada, sem comprometimento da superfície radicular (22–24). O laser de baixa potência pode estimular a movimentação dentária induzida tanto acelerando o processo de reabsorção óssea quanto estimulando a formação óssea. A irradiação com o laser de baixa potência facilita a diferenciação e ativação de osteoclastos levando a áreas de reabsorções ósseas mais abundantes nos grupos com laser comparado ao controle (25,26). Ozawa et al. demonstraram que a irradiação laser estimula a proliferação celular e a diferenciação das células formadoras de nódulos ósseos da linhagem dos osteoblastos,

especialmente em precursores, resultando em um aumento no número de células osteoblásticas diferenciadas bem como na formação óssea (27).

Estudos recentes têm mostrado que algumas proteínas estão envolvidas nos eventos moleculares que ocorrem durante o movimento ortodôntico e o processo de reabsorção radicular (2). Dentre estas proteínas, destacam-se marcadores químicos do tecido ósseo chamados receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK), que representam peptídeos presentes na superfície da célula de precursores dos osteoclastos que, ao se ligarem com seu ligante RANKL, promovem sua diferenciação em osteoclastos, assim como sua fusão, ativação e sobrevivência, aumentando a reabsorção óssea. Outra proteína importante para regulação da osteoclastogênese é a osteoprotegerina (OPG). Seus efeitos biológicos são opostos aos efeitos mediados pelo RANKL, pois agem como antagonista do receptor solúvel, que neutraliza RANKL e, portanto, impede a interação RANKL-RANK, inibindo assim a diferenciação dos osteoclastos e a reabsorção óssea, e estimulando a apoptose dos osteoclastos (28). A expressão destes marcadores RANK, RANKL e OPG durante a movimentação dentária ortodôntica e aplicação do laser de baixa potência sugeriram que o laser de baixa potência estimula a velocidade de movimentação dentária e o *turnover* ósseo via indução de RANK e RANKL (29,30). Além do papel no tecido ósseo, sugere-se que esta proporção RANKL-OPG nas células do ligamento periodontal, também contribui para a reabsorção radicular durante a movimentação ortodôntica. As células do ligamento periodontal comprimido em casos de reabsorção radicular externa apical podem produzir uma grande quantidade de RANKL e regular, por aumento, a osteoclastogênese. Isso explica o maior aumento de RANKL e a diminuição de OPG nos casos de reabsorção radicular severa (31–33). A atividade osteoclástica é marcada por uma enzima secretada pelos osteoclastos durante o processo de reabsorção óssea que facilita a identificação de osteoclastos, chamada fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) (26,31,34). Além de seu papel na reabsorção óssea, ela tem sido relacionada também ao processo de reabsorção radicular. Yamaguchi et al., em 2006 (31) observaram em seu estudo, que o número de células TRAP positivas foi maior no grupo com reabsorção radicular severa comparado ao grupo sem reabsorção, sugerindo um papel importante destas células na ocorrência de reabsorção radicular apical durante o tratamento ortodôntico.

Outro marcador em potencial da atividade das células clásticas seria o fator osteoclastogênico secretado por células T ativadas (*secreted osteoclastogenic factor of activated T cells* - SOFAT). Esta citocina, recentemente descoberta, induz a

osteoclastogêne de maneira independente do sistema RANKL e tem sido associada a tecidos periodontais (35). Ainda não há estudos na literatura que relacionam esta citocina SOFAT à movimentação dentária induzida, porém, um estudo recentemente publicado demonstrou que as células T têm papel importante durante a movimentação dentária induzida. Neste estudo, a movimentação dentária foi significativamente reduzida em camundongos imunossuprimidos de células T e um número menor de osteoclastos TRAP positivos foi encontrado nestes animais, comparados ao controle. Embora as células do sistema imune sejam produzidas na medula óssea, de maneira geral, há poucos estudos a respeito da interação destas células com as células ósseas, porém, acredita-se que as células T representam um estimulador constante de reabsorção óssea (36).

Em pesquisas em animais, as técnicas de monitoramento da movimentação dentária e reabsorção radicular incluem histologia, quantificação de mediadores inflamatórios (como as técnicas de imunohistoquímica) e microcopia eletrônica de varredura de dentes individuais extraídos. Atualmente, a microtomografia computadorizada (Micro-CT ou μ CT) representa uma nova técnica de monitoramento de experimentos com animais e tem um grande potencial para utilização em pesquisa. O exame de Micro-CT tem sido utilizado como uma ferramenta de pesquisa em várias aplicações, como a avaliação da estrutura óssea trabecular e osso cortical, reparação de defeitos ósseos através de estudo morfométrico, medição da densidade e análise de mineralização (24,37). A Micro-CT é um método rápido e não invasivo. O uso da Micro-CT permite avaliação da microarquitetura do osso trabecular, permitindo medições tais como, volume completo de uma região de interesse, volume ósseo de uma região, análise da superfície de uma região específica, cálculo de proporções entre volume ósseo e o volume total, densidade da superfície óssea, cálculo de número de trabéculas, espessura das trabéculas, e a região de separação entre as trabéculas, porosidade, entre outras. Poucos estudos tem avaliado a mudança da densidade mineral óssea que ocorre durante a movimentação dentária, como também as alterações tridimensionais na microestrutura do trabeculado ósseo.

Se considerarmos que o laser de baixa potência pode agir na remodelação óssea, no lado onde ocorrerá a reabsorção óssea, este processo será acelerado, levando a uma consequente movimentação dentária mais rápida, e ao mesmo tempo, diminuindo o risco de compressão exagerada do ligamento periodontal e a morte dos cementoblastos, e consequente reabsorção radicular. Embora relatos na literatura sugiram que o laser de baixa potência possa afetar de maneira positiva o processo de reabsorção óssea e, assim,

acelerar a movimentação dentária ortodôntica, faltam estudos a respeito do efeito da aplicação do laser no que diz respeito à mudança estrutural óssea e ao processo de reabsorção radicular induzido pelo tratamento ortodôntico, desde seu início a nível celular e molecular até seu resultado a nível tecidual, incluindo a mensuração volumétrica de sua resposta tecidual. Uma vez que ambos os processos, de reabsorção óssea e radicular, parecem ocorrer de maneira similar por vias metabólicas e celulares, quando da aplicação do laser de baixa potência para estimular a aceleração da movimentação dentária, é possível que haja um efeito concomitante no processo de reabsorção radicular. Este trabalho considerou a hipótese que a aplicação do laser de baixa potência pode acelerar a movimentação dentária e diminuir a quantidade de locais de aparecimento de áreas de reabsorção radicular e também sua severidade e extensão, o que validaria sua aplicação na prática ortodôntica de rotina.

2. OBJETIVOS:

Objetivo Geral:

O objetivo deste trabalho foi analisar o processo de remodelação óssea (reabsorção e neoformação óssea) e reabsorção radicular durante a movimentação dentária induzida dos primeiros molares superiores de ratos da linhagem *Wistar* submetidos à terapia com laser de baixa potência durante movimentação dentária induzida.

Objetivos Específicos:

Avaliar o efeito do laser em baixa potência quanto à:

- aceleração da movimentação dentária por meio de medições lineares;
- avaliação histomorfométrica das áreas presente de osso alveolar nos lados de tensão e compressão, áreas de hialinização e lacunas de reabsorções radiculares em todos os dias estudados.
- análise imunoistoquímica semi-quantitativa e quantitativa dos marcadores RANKL, OPG e TRAP para avaliação do processo de remodelação óssea nos dias 0, 3, 6 e 9.
- Análise pelo ensaio *western blotting* da quantidade de expressão das proteínas RANKL e SOFAT nos dias 0, 14 e 21.
- avaliação por imagens de microtomografias computadorizadas para mensuração volumétrica das lacunas de reabsorção radicular e características do osso alveolar nos lados de tensão e compressão nos dias 0, 14 e 21.
- avaliação das lacunas de reabsorção radicular por imagens de microscopia eletrônica de varredura nos dias 3, 6, e 9.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Marcadores para Movimentação Ortodôntica

Alhashimi et al. (2001) estudaram o papel das interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), e factor de necrose tumoral- α (TNF- α), citocinas pró-inflamatórias que estão associadas na remodelação óssea, reabsorção óssea, e deposição óssea. No presente trabalho, foi mensurada a expressão de RNA mensageiro de IL-1 β , TNF- α e IL-6 nos dias 3, 7, e 10 dias após a aplicação de força ortodôntico nos primeiros molares superiores pelo método de hibridização *in situ*. O lado contralateral e 3 ratos não tratados serviram como controle. Após a aplicação de força, a indução de IL-1 β e IL-6 alcançaram o máximo no dia 3 e em seguida a diminuíram. Nenhum RNA mensageiro de qualquer das citocinas foi medida nos dentes de controle. A expressão de RNA mensageiro do TNF- α não foi detectada em qualquer ponto de tempo do estudo nos lados experimentais ou contralaterais ou nos animais do grupo não irradiado. Os dados deste estudo suportam a hipótese de que estas citocinas pro-inflamatórias podem desempenhar papéis importantes na reabsorção óssea após a aplicação de força ortodôntica (38).

Kanzaki et al. (2004) estudaram o efeito da transferência local de osteoprotegerina (OPG) ao periodonto com intuito de neutralizar a atividade de RANKL induzida pelas forças mecânicas compressivas, portanto inibindo a osteoclastogênese e potencialmente o movimento dentário. A atividade de reabsorção óssea foi mensurada por meio de contagem de células clásticas TRAP positivas, que se apresentou significativamente reduzida com a transferência local de OPG e consequentemente, reduziu a movimentação dentária após 3 semanas de aplicação da força (23).

Basaran et al. (2006) realizaram um estudo com o objetivo de determinar níveis de citocinas durante a movimentação dentária. O estudo envolveu 15 pacientes (9 do gênero feminino, 6 masculino, idades de 15 a 19 anos) antes e durante o tratamento ortodôntico. As citocinas interleucinas 2, 6 e 8 foram avaliadas por meio de coletas do fluido gengival crevicular antes da instalação do aparelho fixo e 7 e 21 dias após. Coletas também foram feitas em 6 meses e 21 dias seguintes. Aumentos no volume do fluido gengival crevicular e na concentração das interleucinas 2, 6 e 8 foram observadas durante o tratamento ortodôntico. Os autores concluíram que estas citocinas proinflamatórias desempenham um papel importante na reabsorção óssea de maneira direta e indireta (39).

Dunn et al. (2007) examinaram o papel da osteoprotegerina (OPG) na regulação do metabolismo ósseo induzido pelo movimento dentário com força de 54g e avaliados nos dias 0, 3, 7, 10, 14, 17 e 21. A injeção de OPG foi realizada duas vezes por semana e duas doses foram comparadas, 5,0mg/kg (alta) e 0,5mg/kg (baixa), no aspecto mesial do primeiro molar e foram avaliados o deslocamento dentário, as mudanças no osso por meio de microtomografia computadorizada e análise histomorfométrica e contagem do número de células TRAP positivas. A alta dose de OPG aplicada mostrou uma redução potente no movimento mesial dos molares, uma redução na quantidade de osteoclastos comparados ao grupo não irradiado ($p<0.01$) e, contrariamente, mostrou maior fração de volume ósseo (BV/TV) presente comparado aos grupos de dose baixa de OPG e controle. O movimento dentário foi inibido em 45,7% , 70,6 % e 78,7% nos dias 7, 14 e 21 respectivamente, comparado ao controle. A dose de 0,5 mg também inibiu movimento molar em 7 dias (43,8 %) e 14 (31,8 %). A dose mais baixa não reduziu de maneira significativa o número de osteoclastos presentes. A entrega local de OPG inibiu a osteoclastogênese e o movimento dentário quando aplicados localmente. Os autores citaram que aplicação de alta dose de OPG pode melhorar a quantidade de osso presente e aumentar a ancoragem ortodôntica(40).

Kim et al. (2007) investigaram as mudanças longitudinais no ligante do receptor ativador do fator nuclear-kB (RANKL) no ligamento periodontal durante movimentação dentária contínua. Ratos Wistar machos foram divididos em grupos experimentais e de controle. O grupo experimental teve os primeiros molares lateralmente expandido por uma força ortodôntica contínua e analisadas nos dias 0, 1, 3 e 7 dias após a expansão. As secções foram observadas por coloração imunológica para fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) e anti-RANKL. Os resultados mostraram que maior imunorreação de RANKL e células TRAP-positivas foram observados no lado comprimido da expansão nos dias 3 e 7, comparado ao dia 1. Apesar de observada após 1 dia no lado de compressão do grupo de expansão, poucas células TRAP-positivas foram observadas. Após 3 e 7 dias de ativação da expansão, um número maior de células TRAP positivas foram observadas no lado de compressão. Os experimentos mostraram que as células LP estão continuamente produzindo RANKL no lado da compressão do LP de ratos submetidos a estresse mecânico com uma força ortodôntica contínua, mas não não foi perceptível o aparecimento excessivo de osteoclastos. Considerando isto, espera-se que não apenas a produção de RANKL, mas também outras citocinas desempenham um papel importante no equilíbrio a remodelação óssea alveolar(30).

Xie et al. (2008) estudaram a distribuição espacial e sequencial de precursores de osteoclastos durante a movimentação dentária experimental usando três marcadores de diferenciação: receptor do fator estimulante de colônias de macrófagos (c-Fms), receptor ativador do fator nuclear-kB (RANK) e receptor da calcitonina (CTR). Foram utilizados ratos Wistar e inseridos elásticos entre o 1º e 2º molares superiores para 1, 2, 3 e 6 dias. Análise imuno-histoquímica para c-Fms, RANK, ou CTR foi realizada em secções parassagitais e células positivas foram contadas. Os resultados do estudo revelaram que antes da aplicação da força, muitas C-Fms e alguns precursores RANK estavam presentes na medula óssea, mas não foram observados no ligamento periodontal (LP). Após a aplicação da força, a quantidade de RANK, mas não c-Fms aumentou rapidamente no LP. Na medula óssea, o número de células positivas a c-Fms aumentou rapidamente, bem como RANK e CTR. Após 6 dias, os perfis de expressão tendem a retornar aos níveis basais. Os autores concluíram que precursores de osteoclastos diferenciam dentro da medula óssea e, em seguida, migram para o PDL durante o movimento do dente precoce(41).

Kitaura et al. (2009) examinaram o efeito da presença do anticorpo anti-c-Fms no processo de odontoclastogênese e reabsorção radicular durante a movimentação dentária. O anticorpo anti-c-Fms age contra o receptor c-Fms do M-CSF (fator ativado das colônias de macrófagos) bloqueando a odontoclastogênese e portanto o movimento dentário. O anticorpo anti-c-Fms foi injetado diária e localmente durante 12 dias durante a aplicação da força de movimentação do dente e o processo de odontoclastogênese e reabsorção radicular foram avaliados por histologia e microscopia de eletrônica de varredura. Um número significativamente menor de odontoblastos foram encontrados na superfície da raiz mesial nos animais que foram administrados anticorpo anti-c-Fms. Após a movimentação dentária, foi observada reabsorção radicular. No entanto, no grupo em que o anticorpo anti-c-Fms foi injetado, a reabsorção radicular foi prevenida. Os autores concluíram que o anticorpo M-CSF e/ou o seu receptor pode ser uma potencial terapia para o tratamento da reabsorção radicular induzida por estresse durante o movimento dentário ortodôntico(42).

Gonzales et al. (2009) investigaram as mudanças no espaço do ligamento periodontal (LP) em sua largura e o movimento dentário tridimensionalmente com aplicação de forças em diferentes magnitudes por 28 dias: 10g, 25g, 50g e 100g por meio de análise por microtomografia computadorizada. A resolução utilizada para aquisição da imagem foi de 30µm. O LP foi medido nos dias 0 e 3 e as mensurações na posição dos

dentes foram medidas no dias 0, 10, 14 e 28. A avaliação inicial de largura do LP não apresentou diferença estatística entre as diferentes magnitudes de força, e se apresentou reduzido no lado de compressão e aumentado no lado de tensão para todos os grupos até o dia 3. A movimentação dentária foi registrado 1 hora após a aplicação da força e aumentou gradualmente com o tempo. Do dia 1 ao dia 3, uma pequena movimentação foi observada, dos dias 3 ao dia 10, um período de latência foi observado para todas as forças estudadas. Os autores sugeriram que este período de latência é produzido pela hialinização do LP nas áreas de compressão e que nenhum movimento dentária ocorre até que as células consigam remover todo o tecido necrótico. A partir do dia 10 até o dia 28, a taxa de movimentação aumentou, sendo que foi observada uma maior movimentação dentária, quando foi aplicado 10 g de força (2x mais que nos outros grupos)(43).

Brooks et al. (2009) buscaram compreender a base molecular do movimento dentário ortodôntico precoce, analisando a expressão das proteínas KI-67, fator de transcrição Runx2, e o ligante membro 11 da superfamília do fator de necrose tumoral (RANKL). Foi utilizado um modelo de rato do movimento dentário ortodôntico *Split-mouth design* (onde o lado contralateral serve como um controle) e realizada coloração imunoistoquímica para mapear a expressão das três proteínas em 3 e 24 horas após a inserção do aparelho. Observou-se aumento da expressão de Ki-67, um marcador de proliferação e RANKL, uma molécula associada com a diferenciação osteoclástica, nos locais de compressão do ligamento periodontal em 3 horas de força. Em contraste, houve um aumento da expressão de KI-67 e Runx2, um marcador de precursores dos osteoblastos, em áreas de tensão depois de 24 horas de força. Houve diminuição na expressão de KI-67 no ligamento periodontal das raízes mesial e distal a nível do ponto médio da raiz do dente. A expressão RANKL inicial indica que nesta fase precoce células estão envolvidas na sinalização precursoras de osteoclastos. Além disso, a diminuição da expressão de KI-67 encontrado perto se acredita que o ponto médio da raiz do dente para representar o centro de rotação, proporcionando um meio de visualização dos padrões moleculares de força mecânico(44).

Zhuang et al. (2011) investigaram os efeitos da magnitude de força na estrutura óssea do trabeculado alveolar e na reabsorção radicular por meio das alterações na densidade óssea mineral e mudanças tridimensionais na microestrutura do osso trabecular por meio imagens de microtomografia computadorizada. Onze ratos foram divididos em 2 grupos de acordo com a força exercida pela mola de ativação do aparelho: 30g e 100g. As amostras foram scaneadas usando um tomógrafo SkyScan 1172 com resolução de 5µm por

pixel em 40 minutos e reconstruídas em um total de 900 cortes transversais. Foram avaliadas as seguintes informações da microestrutura do osso trabecular a partir de um cubo de 300µm localizado no terço apical da raiz mesial dos molares movimentados: fração do volume ósseo e volume ósseo total (BV/TV), espessura das trabéculas (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N) e separação entre trabéculas (Tb.Sp). A fração de BV/TV aumentou significativamente em ambos os grupos de 30g e 100g comparado ao controle, e separação entre as trabéculas do grupo 100 g diminuiu significativamente em relação aos controles ($p<0,05$). Para outras medidas como o número de trabéculas e espessura, não houveram diferenças significantes entre os grupos. O volume total da reabsorção radicular em todos os grupos experimentais e o volume reabsorção na superfície distal no grupo de 100g aumentou significativamente em comparação com o controle ($p<0,01$). O volume da superfície da raiz mesial superior no grupo de 30g aumentou significativamente em comparação com o grupo de 100 g e controle ($p<0,05$). Os autores concluíram que o osso trabeculado alveolar se mostrou mais denso após a força ortodôntica aplicada por 14 dias. Os efeitos de 30 g e 100 g forças ortodônticas sobre reabsorção radicular eram diferentes na superfícies mesial e distal das raízes mesiais dos primeiros molares superiores(45).

Kim et al. (2012) avaliaram a localização de fatores reguladores de atividade osteoblástica, osteopontina e osterix no ligamento periodontal durante a movimentação dentária com aplicação de forças pesadas em ratos. Foram aplicadas 100g de força nos primeiros molares superiores de vinte ratos machos e a taxa de movimentação foi medida em 3, 7, 10 e 14 dias. Células osteopontina positivas foram observadas ao longo da linha do cimento e osso em ambos os lados de tensão e pressão. Células positivas a osterix foram marcadamente detectadas na superfície do osso alveolar e cimento de ambos os lados. Os autores concluíram que ambos os marcadores desempenham um papel importante na diferenciação e formação de matrix de osteoblastos e cementoblastos durante a remodelação do ligamento periodontal(46).

Taddei et al. (2012) desenvolveram um protocolo padronizada para avaliação da movimentação dentária em ratos e investigaram a expressão de marcadores ósseos para reabsorção e deposição, nos lados de pressão e tensão. Foram aplicadas 0.10N, 0.25N, 0.35N e 0.50N de força nos primeiros molares superiores dos ratos, que foram sacrificados em 0, 12 horas e 72 horas. Os resultados da marcação da fosfatase ácida tartarate resistente (TRAP) mostraram maior aumento na sua atividade no lado de maior reabsorção (lado de compressão), comparado ao grupo não irradiado. O maior grau de movimentação dentária e recrutamento de osteoclastos foi observado quando aplicadas as forças de 0.35N e 0.50N.

Porém reabsorções radiculares mais significantes foram observadas no grupo de força de 0.50N. Assim o estudo concluiu que a força de 0.35N pode ser a ideal para o modelo de movimentação dentária induzida em ratos(47).

Ru et al. (2012) observaram as mudanças na micro-arquitetura do osso alveolar e raízes dentárias durante o movimento ortodôntico. Molares de ratos foram movidos utilizando-se uma força de 10g por 14 dias e posteriormente scaneados usando micrótomo Skyscan com resolução de 18 μ m/pixel. Cubos de 360 μ m nos aspectos mesial e distal das raízes mesiais dos primeiros molares foram avaliados quanto aos parâmetros: fração do volume ósseo e volume ósseo total (BV/TV), espessura das trabéculas (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N) e separação entre trabéculas (Tb.Sp). Além disso, as lacunas de reabsorção radicular foram segmentadas e analisadas por meio de software que utilizava algoritmo convexo nulo para cálculo volumétrico nos dias 3, 7 e 14 dias. A partir do dia 3 ao dia 7, a fração de BV/TV, a espessura das trabéculas e separação das trabéculas diminuíram significativamente no lado de compressão, mas os mesmos parâmetros aumentaram significativamente no lado de tensão desde o dia 7 ao dia 14. O volume de reabsorção radicular na raiz mesial aumentou significativamente no dia 7 de aplicação da força ortodôntica. O estudo concluiu que reabsorção do osso alveolar e reabsorção radicular foram observados principalmente no terço apical no dia 7 no lado de compressão; formação óssea foi observada no dia 14 no lado da tensão durante a movimentação ortodôntica(48).

Wahab et al. (2013) compararam os efeitos de duas forças ortodônticas aplicadas, avaliando a atividade da fosfatase alcalina por coletas do fluido gengival crevicular, assim como a taxa de movimentação dentária mensurados em modelos de estudo (durante 5 semanas) e a quantidade de reabsorção radicular, em radiografias. Doze indivíduos do gênero feminino compuseram a amostra, onde os dentes caninos foram movimentados aplicando-se forças de 100g e 150g em cada lado. O nível de atividade da fosfatase alcalina teve seu pico na primeira semana no grupo de 150g com diferença significativa do grupo de 100g. Nenhum sinal de reabsorção radicular foi detectada em ambos os grupos e o grupo de 150g produziu movimento dentário mais rápido (25%)(49).

Barbieri et al. (2013) avaliaram a expressão de citocinas ligadas à remodelação óssea: receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK), osteoprotegerina (OPG), osteopontinas e fator transformador de crescimento (TGF- β 1). RANKL são expressos por osteoblastos e estimulam a proliferação e inibição da apoptose de células clásticas, já o TGF- β 1 pode modular o metabolismo ósseo estimulando a produção dos fatores

estimulantes de colônias de macrófagos (M-CSF). As amostras do sulco gengival crevicular foram coletadas nos lados tensão e compressão a 0 e 24 horas e 7 dias após a colocação de separadores. Os volumes de amostra do GCF foram medidos utilizando o Periotron 8000, e as concentrações totais de proteínas RANK, OPG, OPN e TGF foram determinadas pelo ensaio ELISA. A concentração de OPG mostrou-se significativamente diminuída no local de compressão nas 24 horas, e a quantidade de concentração das de RANK diferiram significativamente entre o controle, compressão, e lado de tensão após 7 dias. Um aumento significativo nos níveis de TGF- β 1 foi detectado também no lado de compressão comparado ao controle e tensão após 7 dias. O estudo concluiu que mudanças no metabolismo ósseo após a inserção do elástico separador incluíram níveis elevados dos mediadores de reabsorção (por exemplo, RANK e TGF- β 1) e diminuição dos níveis de mediadores de formação óssea (OPG). Mudanças nesta dinâmica ocorreram em curto prazo (24 horas) e longo prazo (7 dias)(50).

Grant et al. (2013) investigaram citocinas e marcadores biológicos presentes no tecido e associados ao metabolismo ósseo por meio de coletas do sulco gengival crevicular (FGC) de pacientes submetidos a tratamento ortodôntico que incluía extrações de primeiros pré-molares e movimentação dos caninos em direção ao espaços das extrações. As coletas do FGC foram realizadas antes do início do tratamento, 3 meses em tratamento (após extrações), 4 horas, 7 dias e 42 dias após aplicação da força nos caninos. As citocinas (GM-CSF, interferon- γ , IL -1 β , IL - 2, IL - 4, IL - 5, IL - 6, IL - 8, IL - 10 e TNF- α), biomarcadores de tecido (MMP-9, TIMP- 1 e 2) e dos ossos indicadores do metabolismo (RANKL e OPG) foram medidos em GCF usando ensaios ELISA. O lado de tensão adjacentes aos caninos apresentaram aumentos significativos nos níveis de IL -1 β , IL-8, TNF- α , MMP - 9 e TIMP 1 e 2 em todos os tempos estudados, após a aplicação da força, enquanto locais de compressão exibiram aumentos nos níveis de IL -1 β beta e IL - 8, após quatro horas, MMP - 9, após 7 e 42 dias e após 42 dias de RANKL. Estes dados demonstram que os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e biomarcadores de tecido e o metabolismo ósseo no FGC estão associados com a aplicação de força ortodôntica. Níveis elevados foram evidentes em 4 horas, mas continuou por períodos de até 6 semanas. Os dados sugerem que a análise GCF biomarcador pode ajudar a otimizar forças ortodônticas para pacientes de maneira individual(51).

Flórez-Moreno et al. (2013) tiveram como objetivo determinar se as variações nas concentrações salivares de ativador do receptor solúvel do ligando fator nuclear kappa B (RANKL) e da osteoprotegerina (OPG), e as razões entre elas, pode estar relacionada

com as diferentes fases da movimentação ortodôntica. Vinte indivíduos saudáveis em tratamento ortodôntico com aparelho fixo não envolvendo extrações de dentes ou procedimentos cirúrgicos foram selecionados. Amostras de saliva não estimuladas foram recolhidas a partir de cada paciente, antes de montar os aparelhos ortodônticos, e em 24 a 48 horas, 2 semanas, 5 semanas, e 8 semanas após a ativação. As concentrações salivares sRANKL e OPG foram determinadas por ensaios imunoenzimáticos. Em geral, os resultados mostraram que os valores médios de sRANKL apresentaram aumentos significativos, valores médios salivares de OPG mostraram uma tendência de queda significativa, e a relação sRANKL/OPG tendeu a aumentar significativamente ao longo do tempo após a visita de ativação. No entanto, as flutuações claras nos resultados imunoenzimáticos foram observadas nos diferentes tempos de amostragem, indicando as tendências não-lineares nos níveis de biomarcadores através do tempo. Os testes post-hoc mostraram diferenças significativas entre (1) todos os valores relativos aos sRANKL do tempo de amostragem de 8 semanas; (2) os níveis baseline / 8-semana para OPG; e (3) da baseline, 24 a 48 horas, e 2-semana na razão sRANKL/OPG em comparação com os do ensaio de 8 semanas. Foi possível concluir que as variações nas concentrações salivares de sRANKL e OPG e suas razões podem estar ligadas a diferentes fases do movimento dentário(52).

Nakano et al. (2014) investigaram a diferença nos movimentos dentários de inclinação e translação (movimento de corpo) relacionados à velocidade de movimentação dentária e a quantidade de reabsorção radicular. A movimentação dentária foi analisada com forças de 10, 25, 50 e 100g. As amostras foram scaneadas em microtomógrafo com resolução de 20 µm no dia 0 e dia 28. A quantidade de movimentação dentária foi medida pela distância entre o primeiro e segundo molares e para a análise da reabsorção radicular, as raízes mesial e distal foram avaliadas, e a região apical descartada pela dificuldade de delimitação das crateras de reabsorção radicular e grandes variações anatômicas. Além disso, foram escolhidas apenas o lado mesial das raízes para avaliação (lado de compressão). Os resultados mostraram a quantidade de movimentação dentária no grupo com movimento de translação foi menor que no grupo de inclinação. A maior quantidade de movimentação ocorreu nas força de 10g durante o movimento de inclinação e 50g no movimento de translação, sendo que a quantidade de movimento diminuiu com a aplicação de força excessiva. Contrariamente, a reabsorção radicular aumentou a medida que a força se tornou mais elevada, sendo que o movimento de inclinação, a reabsorção radicular se mostrou duas vezes maior que no translação(53).

Yan et al. (2015) avaliaram o movimento dentário em ratos imunossuprimidos de células T, baseando-se premissa que as células do sistema immune são formadas na medula óssea, onde interagem com as células ósseas. Segundo os autores, acredita-se que as células T possam ser um estimulador constante de destruição óssea, assim o estudo avaliou as citocinas fator de necros tumoral- α (TNF- α) e interferon- γ produzidos pelas células T auxiliares, além de contagem das células TRAP positivas. Os animais foram divididos em 3 grupos: normal (*wild type* – WT), imunossuprimidos de células T (N) e os imunossuprimidos que receberam uma infusão de células T (N+T). A força exercida pelo aparelho foi de 30g e os animais foram sacrificados após 7 dias. Os resultados mostraram que o movimento dentário reduziu significativamente nos animais imunossuprimidos de células T comparado ao normais. A infusão intravenosa de células T alogênicas, recuperaram a movimentação. Houve aumento do número de osteoclastos positivos à fosfatase ácida tartarato (TRAP) detectados ao redor do osso alveolar após a movimentação dentária nos animais normais, mas quase não foram detectados nos imunossuprimidos. Além disso, a infusão intravenosa de células T resgatou o número de osteoclastos positivos nos imunossuprimidos, sugerindo assim as células T são necessárias para o movimento dentário. Em seguida, revelam a movimentação induziu uma elevação significativa de TNF- α e IFN- γ em torno do tecido periodontal em animais normais, mas não nos imunossuprimidos. A infusão de células T aumento poderia os níveis de TNF- α e IFN- γ nos tecidos periodontais de ratinhos imunocomprometidos. O estudo concluiu que as células T são necessárias para o movimento dentário e está na dependência de citocinas associadas às células T auxiliares(36).

3.2 Efeito do Laser de Baixa Potência na Movimentação Ortodôntica

Ozawa et al. (1998) irradiaram células de osso da calvária de murinos com laser de baixa potência (830 nm, 500 mW, utilizando fibra óptica de 0.6mm de diâmetro), de maneira desfocada e uniforme em uma área circular de 100 mm de diâmetro. A energia total correspondente a 10 minutos de exposição foi de 3.82J/cm². Os resultados mostraram que o laser estimulou a proliferação celular e a diferenciação das células formadoras de nódulos ósseos de linhagem de pré-osteoblastos, resultando em um aumento no número de células osteoblásticas diferenciadas bem como na formação óssea⁶³. Além disso, estimulou a proliferação e diferenciação celular. Os autores verificaram também uma maior atividade da fosfatase alcalina (ALP) e posteriormente um aumento da expressão do gene

osteocalcina que representam importantes marcadores da diferenciação dos osteoblastos, em especial nos primeiros dias do estudo(27).

Kawasaki & Shimizu (2000) relataram que o laser de baixa potência estimulou a quantidade de movimento dentário e a formação de osteoclastos no lado de pressão durante o movimento experimental em ratos. O laser foi aplicado uma vez por dia durante 12 dias por 3 minutos por ponto (3 pontos: mesial, vestibular e palatino), diariamente (total de 13 aplicações). A potência usada foi de 100 mW, comprimento de onda de 830nm e fibra óptica de diâmetro de 0.6mm. A energia total correspondente a 9 minutos de irradiação foi de 54.0J. Os resultados mostraram que o número de osteoclastos aumentou 1.6 vezes (marcadas pela TRAP), o deslocamento do dente foi 1.3 vezes maior, área de osso mineralizado recém-formado foi acelerada em 1.7 vezes no grupo irradiado comparado ao grupo não irradiado(25).

No entanto, o uso do laser na aceleração da movimentação dentária tem sido descrito amplamente na literatura. Cruz et al. (2004) observaram uma maior velocidade, estatisticamente significativa, na movimentação dos caninos em retração, quando irradiados com laser de emissão infravermelha (780 nm, 20 mW) comparando em relação ao lado controle contralateral. A energia utilizada foi de 0,2 J e o tempo de exposição de 10 s por ponto, em um total de 10 irradiações, 5 por vestibular e 5 por palatino (mesial e distal nos terços cervical e apical e uma única no centro da raiz), sendo que a irradiação foi realizada de forma perpendicular e em contato com a mucosa. As aplicações aconteceram no primeiro dia após ativação do aparelho, e nos dias 3, 7 e 14 dias de cada mês, por 2 meses. Os resultados foram obtidos a partir de mensurações por meio de paquímetro digital da distância entre o braquete do canino ao braquete do primeiro molar. Os autores concluíram que o laser apresentou-se como um bom recurso quando se deseja a diminuição do tempo total de tratamento ortodôntico(54).

Aihara et al. (2006) aplicaram laser de baixa potência (810 nm e potência de 50 mW, fibra óptica de 50mW) em células precursoras de osteoclastos de ratos por 1, 3, 6 e 10 minutos em intervalos de 24 h durante o período de cultura, que correspondeu à 9.33, 27.99, 55.98 ou 93.30 J/cm², respectivamente por exposição. A avaliação foi feita por reação imunoistoquímica do receptor ativador nuclear kappa B (RANK) que se une ao seu ligante (RANKL) na superfície das células osteoclásticas, que pode estar envolvido no processo de formação do osteoclasto. A detecção do RANK foi observada pela análise PCR em tempo real após a imunoistoquímica. A expressão da fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP), característica da linhagem macrófaga/osteoclástica também foi

avaliada. O número de células multinucleadas positivas a TRAP aumentou 1.3 vezes nos grupos com irradiação de 3 e 6 minutos. Células osteoclásticas apareceram no dia 2 nos grupos com irradiação do laser e dia 3 no grupo não irradiado. A marcação imunoistoquímica para RANK mostrou-se significativamente maior no grupo laser que o controle, nos dias 2 e 3. Este estudo sugeriu que o laser de baixa potência facilita a diferenciação e ativação de osteoclastos via expressão de RANK e observou-se que as áreas de reabsorção eram mais abundantes nos grupos tratados com laser comparado ao controle(26).

Goulart et al. (2006), em um estudo experimental em cães, avaliaram a velocidade de movimentação dentária dos primeiros molares e segundos pré-molares, tendo os lados contralaterais como controle placebo. Utilizaram dois grupos de cães com diferentes densidade de energias, uma com laser de GaAlAs (780 nm, 70 mW), utilizando energia de 0,2 J, durante 3 s e outro protocolo com aplicação de laser de emissão vermelha (660 nm), 70mW de potência e energia de 1,4 J durante 20 s. As irradiações eram feitas a cada 7 dias, em um total de nove irradiações. A distância entre os segundos pré-molares e os primeiros molares foi medida a cada 21 dias e os resultados encontrados demonstraram que o laser pode acelerar a movimentação ortodôntica, quando aplicado numa dosagem de 0,2 J. Contudo, os autores observaram que dosagens mais altas podem retardá-la(55).

Limpanichkul et al. (2006) avaliaram os efeitos da TLBP na velocidade de movimentação dentária. Foram tratados 12 pacientes durante a retração inicial dos caninos superiores, para o espaço da extração, com molas de NiTi com 150 g de força após alinhamento e nivelamento. O laser utilizado foi o laser de GaAlAs de comprimento de onda de 860 nm e 100 mW de potência. A aplicação foi feita em 8 pontos ao redor dos caninos utilizando uma densidade de potência de $1,11 \text{ W/cm}^2$, tempo de 23 s por ponto, energia de 2,3 J por ponto, durante 3 dias consecutivos. O lado contralateral serviu como grupo não irradiado. O estudo foi duplo-cego e os pacientes avaliados por 3 meses. O laser foi aplicado durante 3 dias consecutivos e repetido por mais 3 meses. Os autores concluíram que não houve diferença estatisticamente significativa em relação à velocidade de movimentação ortodôntica entre o lado irradiado e o não irradiado(56).

Yamaguchi et al. (2007) examinaram os efeitos da irradiação com laser de baixa potência sobre a expressão de M-CSF e c-fms durante o movimento dentário experimental. Um total de 10g de força ortodôntica foi aplicado aos molares dos ratos com intuito de movimentar os dentes. Um laser de diodo Ar-Ga-Al de 810nm de comprimento de onda, a potência de 50 mW, fibra óptica de 5mm de diâmetro, foi utilizado. A irradiação

foi realizada durante 3 min em cada ponto (9min total), uma vez por dia nos dias 0-7 (total de oito vezes), sendo a energia total correspondente a uma exposição de 9 min foi de 54,0 J, uma vez ao dia em um total de 8 vezes. A coloração imunoistoquímica com M-CSF e c-fms foi realizada. O ensaio RT-PCR também foi realizado para elucidar a expressão de c-fms a partir de células precursoras de osteoclastos de ratos irradiados. No grupo de irradiação, a quantidade de movimento de dente foi significativamente maior do que a do grupo não-irradiação. Células coradas positivamente com M-CSF e c-fms foram encontrados significativamente em quantidade aumentada no grupo de irradiação nos dias 2 e 3, em comparação com o grupo não-irradiação. Além disso, a expressão de c-fms em células precursoras de osteoclastos foi detectada numa fase precoce (dia 2 e 3) no grupo de irradiação. Estes achados sugerem que a irradiação com laser de baixa potência estimulou a velocidade de movimentação dentária através das expressões de M-CSF e c-fms(57).

Seifi et al. (2007) usaram coelhos para testar os efeitos de dois protocolos diferentes de aplicação de TLBP na taxa de movimentação dentária comparados a um grupo não irradiado sem irradiação do laser. Em um grupo utilizou-se um laser de 850 nm com potência de 5mW. No segundo grupo, utilizou-se um comprimento de onda de 630 nm com uma potência de 10mW. Os autores relataram uma energia entregue de 8,1 J e 2,7 J para o laser de 850nm e 630 nm, respectivamente, mas não descreveram a densidade de energia e o tamanho da área da ponta. A aplicação foi realizada durante 9 dias consecutivos e após 16 dias, observou-se diminuição, estatisticamente significativa, na movimentação dentária de ambos os grupos comparado ao grupo não irradiado, sendo que com o laser de emissão vermelha (630 nm) houve uma maior movimentação dentária(58).

A influência da laser de baixa potência no sistema RANK, RANKL, OPG também foi avaliada durante a movimentação ortodôntica por Fujita et al. (2008). Os autores pesquisaram a expressão relativa de RANK, RANKL e OPG durante a movimentação dentária ortodôntica usando dois grupos: um experimental com aplicação de TLBP, um grupo experimental com aplicação de laser de baixa potência e um grupo não irradiado. Um laser de diodo Ga-Al-As (Osada Inc., Tóquio, Japão) com um comprimento de onda de 810 nm de ondas contínuas e potência de 100 mW foi utilizado no estudo. O feixe de laser foi entregue por uma fibra óptica de diâmetro 0,6 milímetros, e a irradiação foi feita em contato nos lados mesial, vestibular e palatino. A irradiação foi realizada durante 3 minutos em cada ponto (um total de 9 minutos), uma vez por dia nos dias 0-7 (de um total de oito vezes). A energia total correspondente a um tempo de exposição de 9 minutos, foi de 54,0J. Eles usaram dois métodos de coloração para imuno-histoquímica e

reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para alcançar estes objetivos. Os resultados demonstraram que no grupo com irradiação, a quantidade de movimento dentário foi significativamente maior do que no grupo não irradiado ao final do período do experimento. O número de células que mostraram imunorreações positivas para os anticorpos primários do RANKL e RANK foram significativamente maior no grupo irradiado comparado ao grupo não irradiado. Além disso, a expressão de RANK em células precursoras de osteoclastos foi detectada mais precocemente (dias 2 e 3) no grupo irradiado. Os achados sugeriram que a TLBP estimula a velocidade de movimentação dentária via indução de RANK e RANKL(29).

Youssef et al. (2008) realizaram um trabalho com 15 pacientes adultos. Foi utilizado um laser com o comprimento de onda no infravermelho, de 809 nm. A ponteira do laser foi aplicada na gengiva, por vestibular e por lingual. Os pontos foram distribuídos em um cervical por 10 s, outro no terço médio por 20 s e o terceiro no ápice da raiz por mais 10 s do canino do lado irradiado. Os parâmetros do laser foram 100 mW de potência, totalizando 2J por ponto, na cervical e no ápice, e 4 J no terço médio da raiz. As irradiações foram nos dias 0, 3, 7 e 14 e as ativações foram realizadas com intervalos de 21 dias a cada ativação. No final, os autores obtiveram uma diferença de 50% no aumento da velocidade de movimentação dos caninos submetidos à irradiação comparado com o lado controle(59).

Yoshida et al. (2009) utilizando um laser emitindo em 810 nm e potência de 100 mW, por meio de avaliação histológica e por meio de microtomografia computadorizada em ratos submetidos à tração ortodôntica, com tempo de irradiação de 15 s por ponto (energia de 1,5 J), durante sessões diárias por 6 dias. O total de energia correspondente a 9 minutos de irradiação foi de $54.0\text{J}/\text{cm}^2$. Os animais foram scaneados em um aparelho J. Morita mfg. corp., Kyoto, Japan) com resolução de $30\mu\text{m}$ de tamanho de voxel. A densidade óssea mineral foi medida a partir do lado distal da raiz distovestibular à raiz distovestibular, sendo o espaço delimitado um retângulo de $600 \times 480 \times 1500 \mu\text{m}$ contendo o ligamento periodontal. A densidade óssea mineral (com tendência a redução com o tempo) e maior taxa de movimento dentário no grupo irradiado com laser de baixa potência quando comparado ao grupo não irradiado, no dia 3 (1,4 vezes), 7 (1,19 vezes), 14 (1,26 vezes) e 21 (1,34 vezes) comparado ao grupo não irradiado(60).

Yamaguchi et al. (2010) o presente estudo foi desenhado para examinar os efeitos da irradiação com laser de baixa potência na expressão de MMP-9 (proteína da matriz metaloproteinase envolvida na atividade de osteoclastos), catepsina K (proteínase

de cisteína que desempenha papel essencial na degradação da matriz óssea orgânica), e integrina $\alpha(v)\beta(3)$ [$\alpha(v)\beta(3)$] (função de intermediar a ligação do osteoclasto à matriz óssea) durante o movimento dentário experimental. Estas proteínas estão associadas ao processo de remodelação óssea. Cinquenta machos Wistar foram utilizados aplicando-se uma força total de 10 g aos molares induzir o movimento dentário. Um laser de diodo Ga-Al-As (Osada Inc., Tóquio, Japão) com um comprimento de onda de 810 nm e potência de saída de 100 mW foi utilizado no estudo. O feixe de laser foi entregue por uma fibra óptica de diâmetro 0,6 milímetros, e a irradiação foi administrada em contato com o lados mesial, vestibular e palatino, do dente a ser movimentado. A irradiação foi realizada durante 3 minutos em cada ponto (um total de 9 minutos), uma vez por dia nos dias 0-7 (de um total de oito vezes). A energia total correspondente a um tempo de exposição de 9 minutos, foi de 54,0 J. Para determinar a quantidade de movimentação dentária, modelos de gesso da maxila foram feitos usando um material de silicone impressão antes (dia 0) e após a movimentação dentária (dias 1, 2, 3, 4 e 7). Colorações imuno-histoquímicas para a MMP-9, cathepsina K, e a integrina $\alpha(v)\beta(3)$ [$\alpha(v)\beta(3)$] foram realizadas. No grupo irradiado por laser, a quantidade de movimento dentário foi significativamente maior do que no grupo não irradiado. Células coradas positivamente com TRAP, MMP-9, cathepsina K, e de integrina $\alpha(v)\beta(3)$ [$\alpha(v)\beta(3)$] mostraram-se significativamente aumentadas no grupo irradiado nos dias 2 a 7 em comparação com aqueles no grupo não irradiado ($p<0,05$). Estes achados sugerem que a irradiação com laser de baixa energia facilita a velocidade do movimento dentário e a expressão de MMP-9, cathepsina K, e de integrina $\alpha(v)\beta(3)$ (34).

Gama et al. (2010) estudaram os efeitos da aplicação do laser de baixa potência na movimentação dentária induzida em 30 ratos Wistar. Os animais receberam aparelhos ortodônticos calibrados com aplicação de força de 40 g. O laser de baixa potência de comprimento de onda 790 nm, foi utilizado no grupo experimental; a dose foi de $4,5 \text{ J/cm}^2$ por ponto nos lados mesial, distal e palatino, e de 11 J/cm^2 no lado vestibular, e este procedimento foi repetido a cada 48 horas, num total de nove aplicações. O movimento foi clinicamente avaliado após 7, 13 e 19 dias. Os resultados mostraram não haver diferença estatisticamente significativa, $p=0.079$ (T0-T7), $p=0.597$ (T7-T13), e $p=0.550$ (T13-T19) entre os grupos laser e controle sobre a quantidade de movimentação dentária nos diferentes tempos estudados. Pode-se concluir que a fototerapia a laser, com os parâmetros utilizados não houve aumento significativo na quantidade de deslocamento do dente durante o movimento ortodôntico induzida em roedores (61).

Kim et al. (2010) investigaram os efeitos da irradiação laser de baixa potência sobre no turnover da fibronectina e colágeno tipo I no tecido periodontal durante o movimento dentário em ratos por imuno-histoquímica. Trinta ratos machos Sprague-Dawley foram aleatoriamente divididos em um grupo experimental (n=15) e submetidos a irradiação com laser de diodo Ga-Al-As (comprimento de onda de 808 nm; saída de 96 mW) irradiando três áreas, tanto do lado do palato e do lado vestibular do incisivo superior movimentado, e um grupo não irradiado (n = 15). A radiação foi administrada pelo método de contato de 10 s com dose de energia de $0,83 \text{ J/cm}^2$, uma vez por dia durante 7 dias. A dose total de energia sobre a programação completa foi $34,86 \text{ J/cm}^2$. Os animais foram sacrificados nos dias 1, 3, 7, 14 e 21. Não houve diferença entre os dois grupos na quantidade de movimentação dentária. Os resultados imuno-histoquímica mostraram que a expressão de fibronectina e colagénio do tipo I no grupo experimental tinha aumentado significativamente a partir do dia 1, com uma distribuição mais uniforme do que no grupo não irradiado, e em que esta diferença foi mantida até ao final da experiência. Estes resultados sugerem que a irradiação laser de baixa potência facilita a reorganização dos tecidos conjuntivos durante a movimentação dentária em ratos(62).

Mayahara et al. (2010) investigaram o efeito do laser de baixa potência em células comprimidas do ligamento periodontal na expressão da COX-2 e PLA₂, que são enzimas importantes na produção da prostaglandina E₂, e portanto representam potentes fatores capazes de produzir reabsorções ósseas. Uma força de compressão de 2.0 g/cm^2 foi aplicada por 24hs em células humanas do ligamento periodontal obtida de dentes extraídos para tratamento ortodôntico. A irradiação do laser de baixa potencia (laser Ga-Al-As, 830nm, 3.82 J/cm^2 correspondente a 10 minutos de irradiação) foi aplicada 6 horas antes, 1 hora antes e imediatamente após a aplicação da força de compressão. A expressão da enzimas foram avaliadas por meio de PCR em tempo real. O laser de baixa potência inibiu de maneira significativa a expressão da COX-3 e cPLA₂- α , que estavam aumentados devido a aplicação da força de compressão. Além disto, o laser irradiado imediatamente após a compressão teve o maior efeito inibitório na expressão destes genes, que representam fatores com alta atividade de reabsorção óssea. O laser de baixa potência pode agir reduzindo efetivamente a perda da crista óssea alveolar em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico(63).

Habib et al. (2010) estudaram as alterações microscópicas no osso alveolar durante a movimentação dentária em ratos induzida pela irradiação do laser de baixa potência nos dias 7, 13 e 19. Após o experimento, os espécimes foram processados,

corados com H&E e Sirius red e analisados histologicamente. O laser utilizado possuía 40 mW de potência e 790 nm de comprimento de onda. Densidade de energia de 4,5 J/cm² na mesial de distal e 10 J/cm² na vestibular (irradiação extra-oral) em cada dente por sessão. Os resultados mostraram que o laser mostrou números significativamente maiores de osteoclastos, quando comparados com os controles, tanto 7 e 19 dias, bem como aumentos significativos no número de osteoblastos entre os dias 7 e 13. A quantidade de matriz de colágeno foi significativamente reduzida entre os dias 7 e 13 em ambos os lados de compressão e tensão nos controles, mas não em animais irradiados com laser. Além disso, os grupos laser mostraram significativamente maior deposição de matriz de colágeno no local pressão, para os dias 13 e 19. No local da tensão, observou-se um aumento significativo na quantidade de matriz de colágena em amostras não irradiadas entre os dias 7 e 19. O estudo concluiu que o laser causou alterações histológicas no osso alveolar durante o movimento dentário, incluindo alterações do número de osteoclastos e osteoblastos e na deposição de colágeno em ambas as áreas de pressão e tensão(64).

Duan et al. (2012) compararam a velocidade da movimentação dentária induzida ortodonticamente em molares de ratos quando irradiados com laser de baixa potência com emissão contínua (CW) e emissão pulsada (PW). A movimentação dentária foi induzida aplicando-se uma mola helicoidal de 10g em 40 ratos. Os animais foram divididos em 5 grupos: Grupo 1, irradiados com laser CW de GaAlAs (830 nm, 180 mW, 3.6 J/cm², e 0.9 W/cm² por 4s em 3 pontos por 3 dias consecutivos), Grupo 2, 3 e 4, os animais foram irradiados com laser PW em 2, 4 e 8 Hz, respectivamente (50% do ciclo de irradiação, potência média de 90 mW, 3.6 J/cm², e 0.45 W/cm² por 8s em 3 pontos por 3 dias consecutivos). O grupo 5 serviu como controle. As taxas de movimentação foram mensuradas nos dias 3, 7 e 14. Os resultados não demonstraram diferenças estatisticamente significantes na movimentação dentária entre os grupos, porém foram estatisticamente significantes com relação ao grupo não irradiado em todos os dias analisados. A máxima aceleração da movimentação ocorreu entre os dias 0 e 3 nos grupos irradiados, em comparação com o grupo não irradiado, onde a máxima aceleração ocorreu durante os dias 3 e 7. Foi concluído que ambos os métodos de irradiação levaram a uma movimentação dentária mais rápida comparado ao controle(65).

Genc et al. (2013) avaliaram os efeitos da terapia laser de baixa potência na velocidade do movimento dentário e nos níveis de óxido nítrico no fluido gengival (GCF) durante o tratamento ortodôntico. O óxido nítrico é um marcador de sinalização da

transdução vascular induzida por estresse mecânico. A amostra consistiu de 20 pacientes submetido a tratamento com extrações de primeiros pré-molares superiores e movimentação dos caninos em direção ao espaço. O experimento foi iniciado a partir da retração dos incisivos laterais superiores, sendo que o lado direito compôs o grupo laser, ao passo que os incisivos laterais superiores esquerdo serviram como controle. Um laser de diodo Ga-Al-As foi utilizado e feita irradiações nos dias 0, 3, 7, 14, 21 e 28 dias. Os dentes no grupo do laser receberam um total de dez doses de aplicação do laser: cinco doses no lado vestibular e cinco no lado palatino (dois cervical, um meio, dois apical) com uma potência de saída de 20 mW e uma dose de $0,71 \text{ J/cm}^2$. Amostras de fluido gengival foram obtidos nos dias acima mencionados, e os níveis de óxido nítrico foram analisados. A aplicação da terapia laser de baixa intensidade acelerou ortodôntica movimento significativamente dos dias 7 aos 35; não houve alterações estatisticamente significativas nos níveis de óxido nítrico do fluido gengival durante o tratamento ortodôntico(66).

Habib et al. (2012) avaliaram alterações histológicas, em especial as áreas de hialinização presentes no lado de compressão do ligamento periodontal durante as fases iniciais do movimento ortodôntico, e extensas áreas hialinas pode provocar um atraso importante no movimento de dente, após aplicação do laser de baixa potência durante a movimentação dentária induzida com 40g em ratos adultos jovens do sexo masculino. Trinta animais foram divididos em dois grupos ($n=15$), nomeado de acordo com o momento da morte dos animais (7, 13, e 19 dias). Metade dos animais em cada grupo foram sujeitos a irradiação com laser infravermelho de comprimento de onda de 790 nm, 40mW, onda contínua, diâmetro = 2 milímetros (0.0314cm^2), 1.273W/cm^2 , tempo = $2 \times 112\text{s} + 1 \times 275\text{s}$ (tempo total de 499s), $2 \times 142,6/4,48\text{J} + 1 \times 350/11\text{J}$, $635,2 \text{ J/cm}^2/20\text{J/sessão}$), durante o movimento ortodôntico, a outra metade foram usadas como controles não irradiados. Após a morte dos animais, os espécimes foram seccionados, processados e corados com hematoxilina e eosina (HE) e Sirius Red, e foram utilizados para análise histológica semi-quantitativa por microscopia de luz. Os resultados demonstraram que o laser afetou positivamente a hialinização. No presente estudo, encontramos uma expressão reduzida significativo de hialinização após 19 dias, sendo que a hialinização foi aumentada no dia 7 com redução significativa no dia 13 para o grupo laser. É possível concluir que o uso de luz laser causou alterações histológicas durante o movimento ortodôntico caracterizada pelo aumento da formação de áreas de hialinização em estágios iniciais, e redução tardia quando comparado aos animais não irradiados(67).

Altan et al. (2012) avaliaram os efeitos de laser de diodo de 820-nm sobre a atividade osteoclástica e proliferação das células osteoblástica e liberação dos medidos RANKL/OPG durante a movimentação ortodôntica. Trinta e oito ratos Wistar albinos foram usados neste estudo, onde houve movimentação dos incisivos superiores por uma mola helicoidal com uma força de 20g por 8 dias. Um laser de diodo com uma potência de 100mW e uma sonda de fibra de 2 mm de diâmetro foi utilizado para o tratamento a laser e irradiações foram realizadas em 5 pontos no lado distal da raiz do dente nos dias 1, 2 e 3 de experimento. A energia laser total de 54 J (100 mW, 3,18 W/cm², 1717,2 J/cm²) foi aplicada ao grupo II e um total de 15 J (100 mW, 3,18 W/cm², 477 J/cm²) ao grupo III. O número de osteoclastos, osteoblastos, as células inflamatórias e capilares, e formação de osso novo foram avaliados histologicamente. Coloração imunoistoquímica para PCNA, RANKL e OPG também foram realizadas. Nenhuma diferença estatística foi encontrada para a quantidade de movimentação dentária entre os grupos controle e de estudo ($p>0,05$). O número de osteoclastos, osteoblastos, células inflamatórias, revascularização capilar e formação de osso novo foram encontrados significativamente aumentados no grupo II ($p<0,05$). Os resultados de coloração imunoistoquímica revelou que a RANKL imunoreatividade foi mais forte no grupo II do que nos outros grupos. Quanto a imunorreatividade à OPG, não houve diferença entre os grupos. Os parâmetros de imunoistoquímica foram maiores no grupo III (irradiação com energia total menor) do que no grupo I (controle), enquanto ambos foram menores do que o grupo II (irradiação com energia total maior). Com base nestes resultados, a irradiação laser de baixa intensidade acelerou o processo de remodelação óssea, estimulando proliferação celular e a função osteoblástica e osteoclástica durante a movimentação ortodôntica(68).

Long et al. (2013) realizaram um estudo em forma de revisão sistemática a respeito da efetividade de diversos métodos para acelerar a movimentação dentária. Foram pesquisados periódicos nas principais bases de dados de janeiro de 1990 a agosto de 2011 e selecionados 9 estudos. Dentre os estudos selecionados, 5 intervenções foram encontradas: laser de baixa potência, corticotomia, corrente elétrica, campos eletromagnéticos pulsados e distração dentoalveolar ou periodontal, e dentre os requisitos avaliados, a taxa de movimentação dentária e a presença de reabsorção radicular. Os autores concluíram que o laser de baixa potência é uma ferramenta segura, sem comprometimento da estrutura radicular ou saúde periodontal, porém não foi capaz de acelerar a movimentação dentária. O procedimento de corticotomia, além de seguro foi capaz de acelerar a movimentação dentária. Os outros métodos apresentaram pouca evidência científica(69).

Domínguez et al. (2013) estudaram o movimento dentário, ligante do receptor ativador do fator nuclear KB (RANKL), osteoprotegerina (OPG), e proporção de RANKL/OPG no fluido crevicular gengival (FGC) no lado de compressão e o nível de dor durante o início do tratamento, e assim determinar a eficácia de do uso do laser de baixa potência. Para cada paciente, o primeiro pré-molar superior direito foi escolhido para ser irradiada com um laser de diodo a 670 nm, 200 mW, e $6,37 \text{ W/cm}^2$, aplicada sobre os lados distal, vestibular, lingual durante 9 min nos dias 0, 1, 2, 3, 4 e 7. As amostras de FGC do lado da compressão dos primeiros molares superiores a serem movimentados foram colhidas na *baseline* e após 2, 7, 30, e 45 dias após o tratamento para determinação de RANKL e OPG por ensaio ELISA. Além disso, o movimento dentário foi avaliada por modelos de digitalização e intensidade da dor foi avaliada através de uma escala visual analógica. Houve melhora nos parâmetros estudados (dor, movimentação dentária, níveis de RANKL no GCF, e razão RANKL/OPG) no grupo do laser quando comparado com o grupo não irradiado, embora as diferenças não foram estatisticamente significativas. A retração acumulada do pré-molar superior em 30 dias foi maior no grupo laser, e esta diferença foi estatisticamente significativa entre os grupos. Os autores concluíram que a aplicação do laser de baixa potência em doses repetidas (seis vezes nas 2 semanas iniciais) leva em certa medida, a uma ligeira melhoria ortodôntica(70).

Marquezan et al. (2013) estudaram o efeito de dois protocolos de aplicação do laser de baixa potência durante a movimentação dentária de ratos, variando os dias de aplicação (diária x somente em dias iniciais), durante 8 dias. Foram mesuradas as taxas de movimentação dentária, seguida pela análise histológica a nível celular e tecidual do ligamento periodontal, osso alveolar e superfície radicular. A irradiação foi feita com laser de Ga-Al-As (830nm, potência de 100mW e área de $0,003 \text{ cm}^2$), a fluência aplicada foi de 6000 J/cm^2 , por 3 minutos, correspondendo a um total de energia de 54J. Os resultados mostraram o laser de baixa potência não aumentou a taxa de movimentação dentária, avaliadas no dia 3 ($0,39 \pm 0,04$ no controle e $0,40 \pm 0,06$, no laser) e no dia 8, para nenhum dos dois protocolos estudados ($1,28 \pm 0,10$ no controle e $1,04 \pm 0,06$, no laser com aplicações iniciais e $1,25 \pm 0,11$ no laser com aplicações diárias). Quanto às avaliações qualitativas celulares e teciduais, houve uma maior atividade de reabsorção óssea e radicular nos grupos irradiados no 8 dia, em especial quando as irradiações foram diárias. Houve uma maior presença de vasos sanguíneos no ligamento periodontal nos grupos laser, porém não houve maior movimentação dentária neste grupo comparado ao controle(71).

Jawad et al. (2014) revisaram a literatura a respeito de técnicas promissoras para melhorar o movimento dentário, em particular o uso do laser de baixa potência e o ultrassom pulsado de baixa intensidade. Os autores encontraram na literatura, diversos estudos que correlacionam de maneira positiva o uso do laser de baixa potência com a aceleração da movimentação dentária, redução significativa no nível de dor durante o tratamento ortodôntico e resposta do ligamento periodontal. O trabalho também cita 3 outros que não observaram aceleração da movimentação dentária com a aplicação do laser. Com relação ao uso de ultrassom pulsado de baixa intensidade, os autores encontraram que este método promove um reparo de fraturas ósseas, além de reparo em outros tecidos como: cartilagem, disco intervertebral e músculos. Além disso, o ultrassom pode ajudar a solucionar diversos problemas considerados como desafiadores na ortodontia, como a reparação de reabsorções radiculares induzidas. Os autores concluíram que ambas as técnicas são ferramentas úteis para a prática clínica da ortodontia se usadas de maneira adequada, pois representam uma técnica não invasiva e com poucos efeitos colaterais. Assim, é necessário o entendimento de seus princípios e interações com os tecidos biológicos(72).

Shirazi et al. (2015) avaliaram os efeitos do laser de InGaAlP com comprimento de onda de 660 nm sobre a taxa de movimentação dentária e exame histológico. Foram selecionados trinta ratos Wistar machos divididos aleatoriamente em dois grupos de 15 cada um: irradiados e não irradiados. O grupo não irradiado recebeu aparelho ortodôntico unilateral (grupo a), mas o grupo irradiado por laser recebeu *split mouth design*, com aparelho ortodôntico em ambos os lados e por uma irradiação laser de um só lado (grupo b) e no lado contralateral (grupo c), em um total de 60 g de força aplicada. O laser de diodo (660 nm) foi irradiada com uma potência de saída de 25 mW no modo contínuo durante um tempo total de 5 minutos no grupo irradiado por laser. A energia total foi de 7.5J. Após 14 dias de movimentação ortodôntica, no grupo irradiado com o Laser, a quantidade de movimento de dente foi significativamente maior do que a do grupo não irradiado (2,3 vezes), mas não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos não-irradiadas e indiretamente irradiados. Estudos histopatológicos revelaram que o número de osteoclastos no grupo irradiado Laser foi significativamente maior do que a do grupo não irradiado (1,5 vezes), enquanto que este resultado foi quase o mesmo os grupos não irradiados e o indiretamente irradiados. O estudo sugeriu que o laser de baixa intensidade pode acelerar a taxa de remodelação óssea(73).

3.3 Reabsorções Radiculares

Lu et al. (1999) investigaram a natureza da reabsorção radicular, resultante das forças intrusivas aplicada ao molares inferiores de rato, por meio de técnicas histológicas e histoquímicas com a análise da fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP). Foram utilizados trinta e oito ratos machos Wistar com aparelho fixo que exercia força inicial de 50 g por de 1, 2, e 3 semanas. Foram avaliados o grau de reabsorção e a distribuição de células positivas para TRAP raiz. Na superfície da raiz, os resultados dos escores positivos para TRAP foram baixos nas regiões apicais. Diferenças significativas nos escores foram encontrados na região inter-radicular das raízes entre os grupos experimentais e de controle para 2 e 3 semanas. Reabsorção óssea mais ocorreu durante o período experimental, como denotado por escores positivos maior no osso do que na superfície da raiz. Diferenças significativas no escore para reabsorção radicular na região apical foram maiores nos grupos de 2 e 3-semana do que no grupo 1 semana. Pode-se concluir que uma maior duração da aplicação da força intrusiva irá causar alterações mais extensas da reabsorção e pode ser um fator de risco significativo para a reabsorção radicular(74).

Low et al. (2005) avaliaram a expressão do mRNA para os genes OPG e RANKL durante a reabsorção radicular induzida pela movimentação ortodôntica. Uma força de 100g foi aplicada aos primeiros molares de ratos machos e analisados após 14 dias. Após a eutanásia, os tecidos foram extraídos e parafinados para análise histológica e parte dos tecidos extraídos para coletas do RNAm. A análise histológica mostrou reabsorção osteoclástica das raízes nas superfícies mesial dos dentes submetidos a forças ortodônticas. A integridade de RNAm foi confirmada por reação da transcriptase reversa em cadeia da polimerase (RT-PCR) para o gene GAPDH, e dos iniciadores específicos para a OPG e RANKL. A análise densitométrica da OPG mostrou um aumento nos níveis de RNAm de OPG em tecidos ósseos submetidos a forças ortodônticos em todos os animais estudados. Em contraste, os baixos níveis de RNAm de RANKL foram detectadas em apenas 5 animais e mostrou apenas uma associação com forças ortodônticos. O estudo conclui que os dados são consistentes com alterações nos níveis de OPG e RANKL em tecidos submetidos a forças ortodônticas e observaram que houve aumento nos níveis de ambos durante a reabsorção radicular com a aplicação de forças pesadas(32).

Para Yamaguchi et al. (2006), o ligante do receptor ativador do fator nuclear-kB (RANKL) desempenha um papel importante na formação de osteoclastos. No entanto, muito pouco se sabe sobre a relação entre a reabsorção apical externa durante o tratamento ortodôntico e o nível de RANKL. A hipótese seria que a força de compressão fosse

responsável pela formação de RANKL e aumento da osteoclastogênese em células do ligamento periodontal (LP) de pacientes com reabsorção radicular apical externa severa induzida ortodonticamente. Amostras do LP foram coletadas a partir de pré-molares extraídos destes pacientes e a classificação quanto à presença de reabsorção e sua severidade foi dada pelos centrais superiores. As células do LP foram então isoladas e submetidas à força de compressão em diferentes magnitudes. Posteriormente, a produção de RANKL e osteoprotegerina (OPG) foram mensurados pelo método ELISA em 0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas, sendo que a quantidade de RANKL também foi determinado pelo método Western Blotting. Foram contadas as células TRAP-positivas, e os poços de reabsorção. Os resultados mostraram que o aumento de RANKL e a diminuição de OPG foram maiores no grupo de reabsorção radicular grave do que no grupo não-reabsorção, sendo que a produção de RANKL aumentou com o aumento da força compressiva e OPG diminui. Os números de células TRAP-positivas e poços de reabsorção também estavam aumentados no grupo de reabsorção radicular grave do que no grupo não-reabsorção. Estes resultados suportam a hipótese de que as células LP compactados obtidos a partir de tecidos com severa reabsorção radicular apical externa pode produzir uma grande quantidade de RANKL e aumentam a osteoclastogênese (31).

Seifi et al. (2009) examinaram a expressão de RNA mensageiro de RANKL durante a reabsorção radicular induzida pela movimentação dentária em ratos quando aplicada força de 60g. Para cada animal, o dente contralateral foi utilizado como controle. No dia 21 os ratos foram sacrificados. Os tecidos de 10 ratos foram embebidos em parafina para exame histológico e matéria removido das lacunas de reabsorção nos lados mesial das raízes dos outros dez ratos foram usados para a extração de RNAm pelo método RT-PCR. Os resultados mostraram nas secções histológicas, analisadas aliado histomorfométrica um aumento significativo na reabsorção radicular no grupo movimentados em comparação com o controle ($p < 0,001$). Estudos densitométricos da banda de expressão de RNAm do RANKL em eletroforese em gel mostraram aumento significativamente da expressão RANKL nas lacunas de reabsorção do grupo com movimentação dentária ($p < 0,001$). Foi possível concluir que o aumento da expressão RANKL está associado com a reabsorção radicular induzida pela movimentação ortodôntica(75).

Tyrovola et al. (2010) estudaram os níveis de duas proteínas ligantes que funcionam como reguladores parácrinos da osteoclastogênese e metabolismo ósseo: osteoprotegerina (OPG) e ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa beta (RANKL) por meio de análise de concentração no sangue e no fluido gengival crevicular

(FGC) e relacionaram estes níveis com o grau de reabsorção radicular induzida pelo tratamento ortodôntico. A avaliação da reabsorção radicular foi realizada nos primeiros molares superiores com força aplicada de 25g por meio de uma mola, apoiada na outra extremidade aos incisivos superiores. Pela dificuldade em obter o FGC nos molares, ele foi colhido nos incisivos. A quantidade de reabsorção radicular foi avaliada por meio de imagens de microtomografia computadorizada (MicroCT) a nível coronário em 180 cortes em direção apical e contagem do número de voxels correspondente à superfície completa da raiz mesial. As amostras foram divididas em alta e baixa concentração de reabsorção radicular. Os resultados mostraram uma correlação positiva entre a concentração de RANKL no sangue e o grau de reabsorção radicular após o tratamento. A razão entre as concentrações iniciais de OPG /RANKL em soro sanguíneo revelou-se um factor de risco independente do grau de reabsorção radicular. A concentração inicial de RANKL no fluido gengival mostrou uma correlação negativa com a concentração inicial de RANKL no soro do sangue e para uma série finita de concentrações iniciais de osteoprotegerina no fluido gengival, a raiz dentária parecia protegida contra a reabsorção radicular externa severa. Finalmente, a concentração de osteoprotegerina no soro do sangue diminuiu significativamente nos casos de reabsorção radicular grave(33).

Zhao et al. (2012) estudaram os efeitos da transfecção local do gene da osteoprotegerina (OPG) nas lacunas de reabsorção radicular durante a contenção. Dezoito 6 semanas de idade ratos Wistar machos foram divididos em três grupos. Todos os ratos foram submetidos a 2 semanas de movimentação ortodôntica seguido por um período de contenção de 2 semanas. Durante a contenção, os três grupos de ratos receberam transfecção local de gene de OPG (OPG grupo de transfecção, n = 6), vector de transfecção simulada (grupo simulado, n = 6), ou nenhuma injeção (grupo de controlo, n = 6). As lacunas de reabsorção radicular de todos os três grupos foram avaliadas in vivo com análise de micro-CT em três momentos diferentes: inicial, o último dia de movimentação ortodôntica, e no último dia de contenção. No grupo de transfecção de OPG, não houve diferença significativa entre a quantidade de reabsorção radicular inicial e no último dia de contenção. No último dia de contenção, o taxa de reparação da reabsorção radicular no grupo com transfecção de OPG foi estatisticamente superior em relação ao índice de reparação dos outros grupos ($p < 0,001$). Os resultados indicaram que a transfecção do gene de OPG localmente melhorou significativamente a reparação de ERR durante a contenção. A transfecção local do gene de OPG pode, portanto, ser uma ferramenta útil para o reparo ERR durante a contenção(76).

Ekizer et al. (2013) avaliaram os efeitos do aplicação do diodo emissor de luz (LED) na taxa de movimentação dentária e na reabsorção radicular induzida em ratos. A amostra consistiu de 20 ratos Wistar de 12 semanas divididos em dois grupos, sendo que no grupo LED (comprimento de onda 618 nm e potência de 20mW/cm²) a irradiação foi feita todos os dias, durante os primeiros 10 dias. A força aplicada por meio de uma mola helicoidal, foi de 50cN no molar superior esquerdo. Distâncias entre o dente a ser movimentado e incisivos, em modelos de gesso, foram medidas com uso de paquímetros digitais nos dias 0, 10 e 21. A área de reabsorção radicular foi medida histologicamente, utilizando um software de imagens e calculada em porcentagem. Os resultados mostraram que a taxa de movimentação dentária foi significativamente maior nos primeiros 10 dias no grupo LED, que também mostrou magnitude de movimentação maior comparado ao grupo não irradiado. Em relação à quantidade de reabsorção dentária, o grupo LED mostrou menor porcentagem ($0,098 \pm 0,066$) comparado ao grupo não irradiado ($0,494 \pm 0,224$). Assim, foi concluído que a aplicação do LED tem o potencial para acelerar a movimentação dentária e inibir efeitos indesejáveis da movimentação, como a reabsorção radicular induzida(77).

Fonseca et al. (2013) estudaram o efeito da terapia LED (940nm com potência de 9.5mW) na quantidade de reabsorção radicular e reparo periodontal durante movimentação dentária induzida em 14 dias. Foi utilizada uma força de 50g em molares de ratos. A irradiação foi feita por 7 minutos, com fluência de 4 J/cm² e densidade de energia de 9,5mW/cm² nos dias 2, 3 e 4. A análise histológica foi feita avaliando as raízes mesio-vestibular do primeiro molar superior. Foram observados o número médio de lacunas de reabsorção radicular em 10⁴µm de superfície radicular, número de osteoclastos e infiltrado inflamatório. Os resultados mostraram que houve um aumento no número de lacunas no grupo não irradiado, estatisticamente diferente, quando comparado ao grupo irradiado. O grupo irradiado mostrou menos osteoclastos e células inflamatórias e maior número de vasos sanguíneos no ligamento periodontal, que o grupo não irradiado. Os autores concluíram que a terapia LED pode melhorar o reparo do ligamento periodontal, assim como a inflamação e também agir diminuindo a quantidade de reabsorções radiculares(78).

Seifi et al (2014) investigaram o efeito do laser de baixa potência na movimentação dentária e reabsorção radicular presente, após uma intervenção onde foi criada um defeito ósseo artificial e preenchimento com enxerto ósseo autógeno em pré-molares de coelhos. A aplicação do laser foi realizado por 14 dias com um laser de 808nm, energia 6J/cm² em modo contínuo. Após 48 dias, os animais foram sacrificados e avaliada

a distância entre os primeiros e segundos pré-molares. A avaliação histológica foi feita calculando o tamanho das lacunas de reabsorção em mm^2 . Os resultados encontrados foram uma maior movimentação dentária nos animais irradiados ($6,0 \pm 0,99\text{mm}$) comparado ao grupo não irradiado ($5,68 \pm 1,21\text{mm}$), sem diferença estatística e uma média de reabsorções radiculares menor ($1,61 \pm 0,43 \text{ mm}^2$) comparado ao grupo não irradiado ($0,18 \pm 0,07 \text{ mm}^2$), sendo estatisticamente significativa. Os autores concluíram que a irradiação do laser de baixa potência combinado ao uso de enxerto autogeno, em casos de defeitos ósseos, pode reduzir o grau de reabsorção radicular de maneira significativa(79).

Nimeri et al. (2014) avaliaram as alterações da superfície radicular por meio de tomografia computadorizada cone beam, em 20 pacientes (idades variando entre 11-32 anos), submetidos a tratamento ortodôntico e irradiação e luz de baixa intensidade (LED, 850nm, 60mW/cm^2 contínuo). As medidas do comprimento radicular (de borda incisal à ápice radicular) foram feitas antes e após a fase de alinhamento e nivelamento nos molares, pré-molares, caninos e incisivos, superiores e inferiores. Os pacientes também foram separados de acordo com o grau de apinhamento inicial, calculado pelo índice de Little. Os autores encontraram uma alteração no comprimento radicular que variou de 0,15 a 0,75mm nas raízes dos dentes superiores e de 0,32 a 1,19mm nos inferiores. Foi possível observar que a quantidade de reabsorção radicular não estava relacionada a quantidade de apinhamento inicial. Eles concluíram que comparado a outros estudos encontrados na literatura, que o uso do LED não causou mais reabsorções radiculares que as comumente detectadas em tratamentos ortodônticos(80).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Terapia Óptica do Centro de Lasers e Aplicações do IPEN-CNEN/SP e contou com a colaboração do biotério do IPEN para seu desenvolvimento.

Todos os procedimentos experimentais seguiram as normas vigentes do Conselho Nacional de Controle Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do IPEN-CNEN/SP (parecer no. 100/12). Este estudo está de acordo com o ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiment*).

4.1 Animais

Foram utilizados 68 ratos Wistar (*rattus norvegicus, albinus*) machos com massa corpórea entre 250-300 g e com aproximadamente 2,5 a 3 meses de idade. Os animais foram provenientes do biotério do IPEN e mantidos em ambiente em condições controladas de 12h de luz e 12h no escuro e sob temperatura constante de 23°C, alimentados com ração triturada e água *ad libitum*.

4.2 Movimento Dentário Experimental

Os animais foram anestesiados com mistura de anestésico e relaxante muscular na dosagem apropriada, aplicados de forma intramuscular com seringa de 1 mL com dose anestésica de xilazina (30 mg/kg) e quetamina (70mg/kg) na dosagem de 1ml/kg.

O animal foi imobilizado com a boca aberta em uma maca especialmente confeccionada para este fim. Utilizamos o modelo para movimentação dentária induzida de Inubushi et al. (81) (Figura 1). O dispositivo foi constituído por uma mola de níquel e titânio, sendo amarrada ao redor dos primeiros molares superiores em uma das extremidades, tracionada e então amarrada em um parafuso de enxerto instalado imediatamente atrás dos incisivos superiores, na outra extremidade (1,5 mm de diâmetro e 3 mm de comprimento, Peclab, Belo Horizonte, MG, Brasil). O uso do parafuso como ancoragem para a ativação possui vantagens, uma vez que é um ponto estável e permite avaliação da movimentação dos molares superiores por um período mais prolongado. Não foram utilizados ancoragem nos incisivos superiores, pois os mesmos sofrem processo de irrupção dentária contínua e a estabilidade do ponto é perdida após 7 dias. Assim, a

ativação da mola foi aferida por meio de um tensiômetro de precisão e a força inicial aplicada foi de aproximadamente 50 cN (equivalente a 50gf). O experimento teve duração total de 3 semanas e os animais foram eutanasiados de acordo com o grupo a que pertencia, como descrito na TAB. 1.

Figura 1: Desenho esquemático representativo do aparelho utilizado.

4.3 Irradiação Laser

Nos grupos experimentais, as hemiarcadas foram irradiadas com laser de diodo de baixa potência (comprimento de onda = 810 nm e potência de 100 mW – Therapy XT - DMC, São Carlos, SP, Brasil). A irradiação foi feita de forma pontual por 15 s na face vestibular e 15 s na face palatina em dias alternados. A área irradiada foi de 0,02 cm². A dose aplicada em cada ponto foi de 75 J/cm² e a energia por ponto de 1,5 J, similares a outros trabalhos na literatura (61,65) (Figura 2). A escolha do protocolo de irradiação em dias alternados também foi feita baseado em estudos na literatura (61,64,68).

Figura 2: Diagrama mostrando os dias de irradiação para cada tempo estudado e os dias em que os grupos foram analisados por MicroCT, imunistoquímica e MEV.

4.4 Avaliação da Movimentação Dentária

A movimentação dentária foi medida clinicamente, com o uso de compasso de ponta seca e paquímetro digital (Mitutoyo, São Paulo, Brasil). O compasso de ponta seca foi utilizado diretamente na boca do animal para determinar a distância do primeiro molar do rato na sua porção lateral (aspecto mesial) e o centro do parafuso. Esta distância foi transferida para um papel contendo linhas horizontais e, com o uso do paquímetro digital, a distância foi mensurada (Figura 1). As medições ocorreram antes (dia 0) e no dia da eutanásia dos animais (dias 3, 6, 9, 14 e 21). Nos animais do grupo GC 14, GL 14, GC 21 e GL 21, isto é, com eutanásia nos dias 14 e 21 dias (controle e laser), a movimentação dentária foi ainda mensurada por meio de imagens de microtomografia computadorizada 3D com a utilização do software Osirix (Osirix Foundation, Geneva, Switzerland). A distância medida pela micro-CT foi o espaço entre os primeiros e segundos molares superiores ao nível oclusal.

4.5 Preparo Histotécnico das Peças para Avaliações Histológica e Imunoistoquímica

Após a eutanásia dos animais em câmara de CO₂, o aparelho ortodôntico foi removido e os ossos maxilares dissecados e osteotomizados. As peças foram imersas em solução de formol a 4%, desmineralizadas em ácido fórmico a 20% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Posteriormente foram emblocadas em parafina e submetidas a cortes de 5 µm de espessura montados em lâminas de vidro.

Para avaliação histológica, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e fotografias foram capturadas em um microscópio Amscope (SKU: B120B-10M -LED Binocular Digital Compound Microscope) e a mensuração, que incluiu medição da área de todas as lacunas de reabsorção radicular presentes ao longo das duas maiores e mais volumosas raízes, mesiovestibular e distovestibular, realizada com software *ImageJ* (National Institute of Health, USA). Contornos das lacunas de reabsorção radicular foram desenhados e as áreas mensuradas, somadas, subdivididas de acordo com sua localização: raiz mesial lado de tensão, raiz mesial lado de compressão, raiz distal lado de tensão e raiz distal lado de compressão e obtida a média e desvio padrão para cada um dos grupos analisados (FIG. 3a).

Além disso, a avaliação histológica incluiu a mensuração da área do osso alveolar nos lados de tensão e compressão. Para tanto, retângulos de 300 µm de altura por

60 µm de largura (proporção largura/altura 1:5) foram previamente desenhados no lado de compressão da raiz distal e lado de tensão da raiz mesial e suas bordas utilizadas como limites para mensuração da área do osso alveolar. O contorno do osso alveolar foi então desenhado respeitando-se os limites do retângulo e a área do osso alveolar mensurada com uso do software ImageJ (National Institute of Health, USA) (FIG. 3b). O mesmo método foi usado para medir a área de tecido hialinizado no ligamento periodontal no lado de compressão para todos os grupos estudados.

Cortes adicionais foram realizados para a análise imunohistoquímica das amostras de 3, 6 e 9 dias e posteriormente submetidos a três tipos de reações imunohistoquímicas. Cortes de 5 µm foram montados sobre lâminas de vidro previamente silanizadas pela solução de 3-aminopropytriethoxy-silane (Sigma Chemical CO, St Louis, Mo/USA) a 10% em etanol absoluto. Foram desparafinizados em dois banhos de xilol, dois banhos de 5 minutos à temperatura ambiente, e outro por 10 minutos. Os cortes foram, então, hidratados em concentrações decrescentes de etanol, a partir de três passagens em etanol absoluto (2 min/cada) seguido por etanol 95% e 70% durante 2 minutos cada. Em seguida, submetidos às seguintes etapas de lavagens e incubações sob agitação a 20 RPM, descritas resumidamente:

- a) três lavagens de 5 minutos em tampão fosfato de sódio (PB), pH 6.0 à temperatura ambiente;
- b) recuperação antigênica com tampão citrato pH 6.0 em panela pressurizada (Decloaking Chamber, Biocare Med), durante 5 minutos;
- c) lavagens em tampão de fosfato de sódio (PB) à temperatura ambiente;
- d) inibição da peroxidase endógena com 3% de H₂O₂ por 60 minutos;
- e) lavagens em PB à temperatura ambiente;
- f) incubação por 24 h à temperatura ambiente, com um dos seguintes anticorpos primários monoclonais ou policlonais: anti-osteoprotegerina (1:100 Santa Cruz Biotechnology- SC 8468); para identificação da RANKL foi utilizado o anticorpo cabra anti-rankl (1:100 Santa Cruz Biotechnology – SC 7628) e anti-TRAP (1:500, SC8665, Santa Cruz Biotechnology, USA) diluídos em solução Antibody Diluent with Background Reducing Components (S3022 Dako laboratories, USA, ; e) duas lavagens de 10 minutos em PB à temperatura ambiente;

g) incubação por 1 h em uma solução contendo anticorpo secundário biotinilado universal obtido em suíno (LSAB kit, K0679, Dako laboratories, USA);

h) lavagens em tampão de fosfato de sódio (PB) à temperatura ambiente;

i) incubação por 1 h com o complexo avidina-biotina peroxidase (LSAB kit, K0679, Dako Laboratories, USA) em PB e temperatura ambiente;

j) lavagens em tampão de fosfato de sódio (PB) à temperatura ambiente;

k) a revelação foi realizada com o cromógeno diaminobenzidina 0,025% (DAB, 3,3-diaminobenzidina, Dako, Carpinteria, CA, USA) segundo as orientações do fabricante. Após a lavagem, foi feita a contra coloração com hematoxilina de Mayer previamente filtrada.

O bloqueio da reação foi feito com lavagens em água destilada seguido de lavagens em tampão fosfato de sódio salino (KPBS). Os cortes histológicos foram desidratados em soluções crescentes de álcoois, diafanizados em xilol e montados com meio de montagem e lamínulas.

A análise da expressão da enzima TRAP foi feita por contagem do número de imunorreações positivas, em um aumento de 100 x do microscópio, para avaliação da atividade de odontoclastos nos processos de reabsorção óssea e radicular. A contagem de células positivas a TRAP incluiu o terço cervical e médio da raiz. A contagem foi realizada com o auxílio da ferramenta *cell counter* do software *ImageJ* (National Institute of Health, USA).

Para a avaliação da expressão dos marcadores RANKL e OPG, áreas do ligamento periodontal correspondente aos terços cervical e médio, foram delimitadas por retângulos de 2 μ m x 0,4 μ m, e examinada em fotografias de aumentos de 200x obtidas no microscópio. A intensidade da imunocoloração de cada proteína foi feita no software Adobe Photoshop CC 2015 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, Califórnia) envolvendo a seguinte sequência: seleção e substituição de cores de fundo da lâmina para branco e alteração de cor da lâmina para tons de cinza. Após este preparo, o software *ImageJ* (National Institute of Health, USA) foi usado para adequar e padronizar o *threshold* da imagem para 0 e 100 e medir a porcentagem calculada da porcentagem da quantidade de pixels pretos pela quantidade de pixels total.

FIGURA 3: Imagem representativa do método para medição e cálculo da área da reabsorção radicular (a) e quantidade de osso alveolar presentes nos lados de tensão e compressão em aumento de 100x (b). P- polpa, LP – ligamento periodontal, OA – osso alveolar, RR – lacuna de reabsorção radicular em aumento de 40x.

4.6 Ensaio *Western Blotting*

Imediatamente após a eutanásia dos animais, amostras de tecidos gengivais ao redor dos primeiros molares superiores nos grupos de 14 e 21 dias, compatíveis com mucosa queratinizada, foram cuidadosamente removidas com auxílio de lâmina de bisturi, sendo imediatamente acondicionadas em tubos Eppendorf contendo tampão RIPA⁺ (10 mM Tris HCl pH 7,5; 10mM desoxicolato de sódio; 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 0,1% SDS, 2μg/ml aprotinina, 2μg/ml pepstatina, 1Mm PMSF) contendo 1% inibidor de protease (Sigma, EUA). O lisado obtido foi centrifugado a 15000 rpm por 15 min e o sobrenadante aliquoteado e estocado a -80 °C. As proteínas do lisado foram quantificadas com o kit *BCA Protein Assay* (Pierce, EUA). A quantificação foi realizada em um aparelho de ELISA (ELX 800 Bio-Tek Instruments, Inc.) em placas de 96 poços contendo 200μl de BCA, além de 25 μl de cada lisado ou 25 μl de BSA, nas concentrações indicadas pelo fabricante, para realização da curva padrão. A leitura foi realizada com filtro de 562nm.

Posteriormente, alíquotas do lisado foram misturadas contendo 20μg de proteína total, com tampão de amostra para concentração final de 1X. Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 min e então submetidas à SDS-PAGE, sendo feita eletroforese a 100V

por 180 minutos, em gel de acrilamida a 10% (Quadro 1). O padrão de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope Prestained Standards (BioRad).

Quadro 1 – Gel 10% acrilamida com SDS (10X16 cm).

	Gel de Separação	Gel de empilhamento
	10% (total 40 ml)	5% (total 10ml)
H ₂ O	15,9	6,80
Acrilamida/bisacrilamida 30:1	13,3	1,70
Tampão de separação	10,0	-
Tampão de empilhamento (4X conc.)	-	1,25
10% SDS	0,4	0,10
10% persulfato de amônio	0,4	0,10
Temed	0,016	0,01

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi feita por eletro-transferência, com o tampão de transferência (48mM Tris-Base; 39mM Glicina, 20% Metanol; pH 8,3) utilizado como recomendado pelo fabricante. A transferência foi feita com 30V por 180min. Após a transferência, a membrana foi submetida à fase de bloqueio ou lavada e seca para posterior reação.

Para a imunorreação, foi feito bloqueio dos sítios inespecíficos com 5% de leite em pó desnatado em TBST, por 1-2h em temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a solução de bloqueio foi removida lavando-se a membrana com TBST. Os anticorpos primários utilizados foram anti-SOFAT (1:1000; Rabbit anti-rat produzido pelo Rheabiotech Laboratory, Campinas, SP, Brazil) e anti-RANKL (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), todos diluídos em solução de bloqueio e aplicado de acordo com o tempo recomendado pelo fabricante e mantido à temperatura ambiente sob agitação. O anticorpo primário GAPDH foi usado como controle endógeno (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Seguiram três lavagens para remoção do anticorpo não absorvido com TBST sob agitação e à temperatura ambiente. O anticorpo secundário foi então aplicado por 1 hora, diluído em solução de bloqueio e depois lavado em TBST 2X por cinco minutos cada. A detecção foi feita por quimiluminescência (kit ECL). As bandas foram digitalizadas e a avaliação da expressão do SOFAT e RANKL foi feita por medição da densidade óptica

utilizando-se o *ImageJ* (National Institute of Health, USA). A densidade óptica da proteína alvo foi normalizada pelo que a proteína GAPDH representou como quantidade relativa da proteína alvo. Os resultados obtidos pelo experimento foram tabulados e submetidos a análise estatística.

4.7 Análise das Imagens de Microtomografia Computadorizada

As amostras dos grupos de 14 e 21 dias foram escaneadas usando Skyscan 1172 (Bruker MicroCT, Kontich, Belgium) e software associado (Version 1.5.23) em uma alta resolução de 5 μm usando um aparelho emissor de raio-X e fonte de voltagem de 70 kV, amperagem de 142 μA , potência de 10 W em uma rotação de 180° ao redor do eixo vertical e um passo de rotação de $0,4^\circ$. As imagens originais foram reconstruídas e convertidas em imagens de Bitmap usando o software nRecon software Version 1.5.23 e as imagens alinhadas com o software de visualização morfométrica Data Viewer (Bruker MicroCT). O software CT Analyser (Version 1.15.4.0, Bruker MicroCT) (82) foi utilizado para realizar as mensurações dos dados analisados.

Para avaliação do osso alveolar nos lados de tensão e compressão, dois retângulos de mesmo tamanho (200 μm largura x 400 μm espessura x 1400 μm altura) foram desenhado com intuito de determinar os limites da avaliação do osso alveolar nas raízes mesiovestibular e distovestibular. Os retângulos foram posicionados paralelos ao ligamento periodontal e adjacentes à parede frontal do osso alveolar (FIG. 4a, 4b e FIG. 5), com intuito de mensurar as mudanças estruturais ocorridas no osso alveolar próximo do ligamento periodontal, durante a movimentação dentária. Dados de densidade óssea mineral (*bone mineral density* – BMD), fração de volume ósseo e volume total (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N) e separação entre as trabéculas (Tb.Sp) foram obtidos nos lados de tensão e compressão.

Lacunas de reabsorções radiculares foram avaliadas usando imagens de Micro-CT após serem reconstruídas e alinhadas, utilizando o software CT Analyzer. Imagens de cortes transversais, a partir da região de furca e/ou junção amelocementária até a região mais apical anterior à camada mais espessa de cimento, foram usados para delimitar a região de interesse contornando cada lacuna de reabsorção radicular (83). No total foram avaliadas 140 cortes para as raízes distais (equivalente a um comprimento da raiz de 700 μm) e 200 cortes para as raízes mesiais (equivalente a um comprimento da raiz de 1000 μm). Todas as lacunas foram medidas volumetricamente de maneira individual e

posteriormente foi calculada a soma volumétrica de todas as lacunas presentes para cada raiz analisada, sendo ainda separada em lados de compressão e tensão (FIG. 4c). As amostras foram nomeadas e alocadas aleatoriamente durante a análise para assegurar o estudo cego.

As aquisições das imagens de MicroCT e as medições utilizando os softwares acima mencionados foram realizadas no departamento de ortodontia da Universidade da Califórnia, Los Angeles.

FIGURA 4: Delimitação do osso alveolar analisado pelas imagens de microtomografia computadorizada nos lados de compressão (a) e tensão (b). Exemplo do desenho da lacuna de reabsorção radicular presente (c). Os pontos mais superficiais e proeminentes da superfície da raiz foram conectados em uma nova linha de fechamento respeitando o contorno anatômico da raiz (83,84). A região de interesse (ROI – region of interest) está em destaque em vermelho.

FIGURA 5: Imagens de MicroCT mostrando a distância mensurada na movimentação dentária (seta branca) e os retângulos delimitando o volume do osso

alveolar nos lados de compressão e tensão avaliados no estudo. OA: osso alveolar, LP: ligamento periodontal.

4.8 Análise das Imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura

Todos os lados das raízes mesial e distal de cada amostra foram fotografadas em microscópio eletrônico de varredura Hitachi TM3000 (Hitachi High-Technologies Corporation, Tóquio, Japão) com intuito de avaliar a morfologia e localização das áreas das lacunas de reabsorção radicular. Todas as elétrons-micrografias foram organizadas em formato de slides de *powerpoint* (Microsoft Powerpoint for Mac 2011, versão 14.5.5, Redmond, USA) para cada amostra a ser avaliada. Uma avaliação semi-quantitativa da reabsorção radicular dos dentes experimentais foi realizada usando uma modificação do método de Han et al. (85). No sistema de escore, a severidade das lacunas de reabsorções radiculares foi classificada em uma escala de 1 a 5, como segue:

- 1 = sem presença de reabsorções
- 2 = até 1/3 do comprimento da raiz com crateras de reabsorção a nível de cimento
- 3 = mais que 1/3 do comprimento da raiz com crateras de reabsorção a nível de cimento
- 4 = até 1/3 do comprimento da raiz com crateras de reabsorção a nível de dentina
- 5 = mais que 1/3 do comprimento da raiz com crateras de reabsorção a nível de dentina

A FIG. 6 representa o delineamento experimental deste trabalho.

FIGURA 6: Fluxograma mostrando o desenho experimental, número de animais estudados e métodos usados nos grupos.

4.9. Análise estatística

As avaliações e medições foram realizadas três vezes em períodos distintos. A confiabilidade intra-examinador para todas as variáveis foi determinada pelo coeficiente de correlação intra-classe (ICC). Ambos os testes foram realizados usando software Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). O teste Smirnov - Kolmogorov foi empregado para investigar a distribuição normal. Para as variáveis quantitativas, a análise de variância dois critérios (*two-way ANOVA*) e seguido pelo teste de comparações múltiplas *post hoc* Bonferroni. O nível de significância adotado para todas as comparações foi de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito do Laser de Baixa Potência na Movimentação Dentária

O grupo Laser demonstrou uma taxa de movimentação maior durante todo o período experimental (3, 6, 9, 14 e 21 dias) quando comparado ao grupo não irradiado, porém esta taxa foi significativamente maior nos dias 9, 14 e 21 dias, mostrado pela comparação entre os dois grupos para cada dia utilizando o teste estatístico t de Student. As médias da movimentação e desvios padrões para o grupo laser ao longo do tempo foram: 3 dias, 260 μm ($\pm 38,07$); 6 dias, 374 μm ($\pm 55,04$); 9 dias, 420 μm ($\pm 74,16$); 421 μm ($\pm 50,9$) e 437 μm ($\pm 42,12$). Para os grupos controles nos diferentes dias, os resultados foram: 3 dias, 178 μm ($\pm 27,74$); 6 dias, 286 μm ($\pm 37,81$); 9 dias, 296 μm ($\pm 56,83$); 292 μm ($\pm 45,02$) e 304 μm ($\pm 46,48$) (FIG. 8). O movimento dentário demonstrou ser significativamente maior no grupo laser nos dias 6, 9, 14 e 21 dias. Este resultado mostrou que o laser foi capaz de acelerar o movimento do dente, aumentando a taxa de movimentação em 46% aos 3 dias, em 31 % após 6 dias, em 42 % aos 9 dias , 44 % aos 14 dias e 43 % aos 21 dias (FIG. 8). Houve uma diferença significativa entre o dia 3 e todos os outros momentos e nenhuma diferença foi encontrada após o dia 6 para ambos os grupos.

FIGURA 8: Representação gráfica da taxa de movimentação ao longo do tempo para os grupos Laser e Controle (média $\pm$ desvio padrão). Letras diferentes indicam $p < 0,05$.

5.2 Efeito do Laser de Baixa Potência no Osso Alveolar e Ligamento Periodontal

Análise Histomorfométrica Descritiva

Lado de Compressão

A descrição microscópica das amostras mostrou que as mudanças teciduais no ligamento periodontal e osso alveolar no lado de compressão quando submetido a força intensa foram caracterizadas no dia 3 por redução do espaço do ligamento no dia 3, com os feixes de fibras colágenas desorganizados e comprimidos e aparecimento de extensas áreas de áreas de hialinização em ambos os grupos, sendo que no grupo Laser, a áreas de hialinização se apresentavam reduzidas em comparação ao grupo não irradiado. Não era notada nas superfícies radicular e óssea, presença de cementoblastos e osteoblastos na presença de áreas de hialinização. Nas extremidades das áreas de hialinização notou-se um aumento da vascularização, possivelmente para estimular a chegada de macrófagos e osteoclastos para reparo do ligamento periodontal e início da reabsorção óssea. Ambos os grupos mostraram uma área reduzida de osso alveolar, sobretudo à distância, no terceiro dia em comparação ao dia 0 mostrando portanto, a presença do processo de reabsorção. Os osteoblastos estavam na superfície da parede frontal do osso alveolar e foi possível notar um aumento no número de osteoclastos presentes em relação ao dia 0, em número maior no grupo Laser.

Aos 6 dias, a camada de osteoblastos se apresentava mais desorganizada com aumento no número de osteoclastos para ambos os grupos, mais expressivo para o grupo não irradiado e mantendo-se com número expressivo no grupo Laser. O ligamento periodontal aos 6 dias apresentava-se menos comprimido, porém ainda reduzido, com fibras colágenas ainda irregularmente dispostas e presença de grande vascularização. No grupo não irradiado áreas de hialinização ainda permanência extensa e redução da área de hialinização no grupo Laser em comparação ao dia 3. Neste dia nota-se que o processo de reabsorção óssea estava ocorrendo principalmente na superfície do osso alveolar próximo ao ligamento periodontal.

Aos 9 dias, observou-se uma reorganização do espaço do ligamento periodontal e intensa vascularização. As áreas de hialinização estava reduzidas em ambos os grupos, sendo mínima no grupo Laser. Na superfície radicular e óssea notou-se a presença da camada de cementoblastos e osteoblastos, exceto onde estavam presentes odontoclastos e osteoclastos. O osso alveolar ainda permanecia reduzido em comparação ao dia 0, com grande número de osteoclastos na superfície óssea em comparação ao grupo não irradiado.

Nos dias 14 e 21, o fenômeno mais evidente no ligamento periodontal é a reorganização e reinserção de fibras colágenas na superfície cementária e óssea, normalização da vascularização. O ligamento periodontal restabeleceu sua largura, e não haviam sinais de áreas de hialinização. Foi restabelecida a integridade das camadas de cementoblastos e osteoblastos e não é redução do número de odontoclastos e osteoclastos. Houve um aumento na área de osso alveolar presente em ambos os dias, sendo que no dia 21, a área de osso alveolar no grupo Laser já havia sido reparada, sendo similar ao osso alveolar no dia 0. O grupo não irradiado apresentou uma área reduzida ainda de osso alveolar.

Lado de Tensão

A avaliação microscópica no dia 3 mostrou um ligamento periodontal de largura maior com as fibras colágenas ainda paralelas e inseridas em sua maioria perpendicular ao osso alveolar e à camada de cimento, porém apresentando-se estiradas. Os vasos sanguíneos estavam levemente comprimidos por estiramento e não foram observadas áreas de hialinização. Cementoblastos e osteoblastos estavam justapostos à superfície e na maior parte, íntegros, exceto por pontos de ruptura no osso alveolar e superfície radicular, em especial para o grupo Laser. A área de osso alveolar se apresentou reduzida no dia 3 e houve um aumento no número de osteoclastos para ambos os grupos em relação ao dia 0.

Aos 6 e 9 dias, o ligamento periodontal ainda permanecia aumento em sua largura, com aumento na vascularização e discreto infiltrado inflamatório mononuclear representado por linfócitos e macrófagos. Osteoblastos e cementoblastos compunham à superfície de maneira justaposta. Ambos os grupos mostraram redução no número de osteoclastos, porém o grupo não irradiado mostrou menor número de osteoclastos que o grupo Laser. Havia uma tendência a restabelecimento da área de osso alveolar, mais evidente para o grupo não irradiado do que no grupo Laser.

Nos dias 14 e 21, o ligamento periodontal se encontra já reorganizado com suas fibras colágenas reinseridas nas camadas de cimento e osso. O ligamento periodontal restabeleceu sua largura. Houve um aumento na área de osso alveolar presente em ambos os dias, sendo que no dia 21, sendo que a área de osso alveolar no grupo Laser mostrou-se evidentemente maior. É possível observar um aumento na deposição de matriz osteóide pelos osteoblastos que posteriormente será mineralizada. O grupo Laser mostrou área de osso alveolar presente similar ao dia 0, portanto promoveu o restabelecimento do osso alveolar, enquanto o grupo não irradiado ainda apresentava redução na área do osso alveolar em comparação ao dia 0.

Análise Histomorfométrica Quantitativa

No lado de tensão, houve redução da área de osso alveolar presente nos dias 3, 6 e 9 comparada ao dia 0 para ambos os grupos. Nos dias 14 e 21, observou-se um aumento da área de osso alveolar. Houve um aumento na área de osso alveolar para os grupos laser e controle nos dias 14 e 21, sendo que o grupo laser mostrou aumento estatisticamente maior comparado ao controle. De maneira interessante, observou-se que, nos dias 6 e 9, os grupos Laser apresentaram menor área de osso que os grupos controle. Além disso, a área de osso alveolar foi considerado significativamente reduzida em todos os dias experimentais em comparação com o grupo 0 dias (sem movimentação). Nos dias 14 e 21, ambos os grupos apresentaram maior quantidade de osso alveolar em comparação aos dias 3, 6 e 9 nos lados de tensão e compressão.

A análise das lâminas histológicas coradas em H&E mostrou áreas reduzidas do osso alveolar nos lados de compressão para ambos os grupos a partir do dia 3. Os dias 3, 6, 9 e 14 foram estatisticamente significantes em comparação ao dia 0 em ambos os grupos. Os dias 3, 6 e 9 não mostraram diferenças significantes entre eles no lado de compressão para ambos os grupos, porém diferentes quando comparados aos grupos de 14 e 21 dias. Aos 14 dias, o osso alveolar ainda se mostrava significativamente reduzido em comparação aos 21 dias. E aos 21 dias, a quantidade de osso alveolar presente já estava completamente restaurada, não sendo diferente em comparação ao dia 0.

O grupo laser nos dias 6 ($p<0.01$), 9 ($p<0.01$) e 14 ($p<0.05$), mostrou que o laser de baixa potência possivelmente influenciou a atividade de osteoclastogênese no lado

de compressão. Já no dia 21, não houve diferença na área de osso alveolar presente no lado de compressão para ambos os grupos (FIG. 9).

FIGURA 9: Representação gráfica da área de osso alveolar nos lados de tensão e compressão ao longo do tempo para os grupos Laser e Controle (média e desvio padrão). Letras diferentes indicam $p < 0,05$.

As áreas de hialinização no grupo Laser foram significativamente menores do que os grupos de controle nos dias 3, 6 e 9 no lado da compressão. O Laser foi capaz de reduzir progressivamente zonas de hialinização em 25% no dia 3, 57% no dia 6 e 70% no dia 9 (FIG. 10). O grupo não irradiado apresentou menor área de hialinização após 9 dias, com pouca diferença entre os dias 3 e 6. Ambos os grupos não apresentaram áreas de hialinização nos dias 0, 14 e 21.

FIGURA 10: Média e desvio padrão da área de hialinização no lado de compressão para grupos Laser e controle. Letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Microtomografia Computadorizada

A avaliação volumétrica do osso trabecular no lado da compressão mostrou que a densidade mineral óssea (BMD) foi significativamente menor no grupo do laser quando comparado com o controle aos 14 dias ($p < 0,01$). Em relação à fração volume de osso/volume total (BV/TV), o grupo laser mostrou menor porcentagem de volume ósseo aos 14 dias ($p < 0,01$), mas não houve diferença entre os grupos aos 21 dias. O grupo laser mostrou significativamente menor espessura trabecular em relação ao controle no lado de compressão aos 21 dias (FIG. 11). Maior quantidade de separação das trabéculas foi encontrada no grupo laser para o dia 14 ($p < 0,001$). Todos estes dados sugerem maior atividade de osteoclastos no lado de compressão no grupo laser aos 14 dias, porém pouca diferença foi encontrada aos 21 dias, além de um aumento significativo na espessura das trabéculas.

No lado de tensão, a BMD foi maior para o grupo laser em ambos os dias estudados, sendo estatisticamente significativa no dia 14. Além disso, BV/TV foi significativamente maior para o grupo laser em comparação ao grupo não irradiado aos 14 dias ($p < 0,05$) e 21 dias ($p < 0,01$). O grupo laser mostrou maior espessura trabecular no dia 21 ($p < 0,001$). A separação entre as trabéculas aos 21 dias no grupo laser mostrou-se estatisticamente menor que no grupo não irradiado ($p < 0,001$). Os dados sugerem uma maior deposição óssea no lado de tensão com a aplicação do laser de baixa potência (FIG. 12).

É possível visualizar estes resultados nas imagens 3D obtidas pela MicroCT. O grupo não irradiado mostrou osso mais compacto no lado de compressão em comparação ao laser, indicando um processo de reabsorção óssea maior. No lado de tensão, o grupo laser mostrou osso alveolar mais compacto que o controle, mostrando uma maior formação óssea com a irradiação do laser (FIG. 13).

FIGURA 11: Gráficos representativos das medidas de densidade óssea mineral (BMD), fração de volume do osso/volume total (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th) e separação das trabéculas (Tb.Sp) no lado de compressão para os grupo não irradiado e laser nos dias 0, 14 e 21. *indica $p < 0,05$.

FIGURA 12: Gráficos representativos das medidas de densidade óssea mineral (BMD), fração de volume do osso/volume total (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th) e separação das trabéculas (Tb.Sp) no lado de tensão para os grupo não irradiado e laser nos dias 14 e 21. * indica $p < 0,05$.

FIGURA 13: Imagem de MicroCT em 3D gerada pelo software OnDemand3D (Cybermed Inc., Seul, Coréia do Sul) mostrando a microestrutura do osso trabecular nos grupos controle e laser no dia 14. O volume da região de interesse utilizado para esta imagem foi cubos de 200 μm . * indicam os espaços no trabeculado ósseo.

Análise Imunoistoquímica

Na avaliação imunoistoquímica, o processo de reabsorção óssea foi avaliado pela quantificação da enzima fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP). Essa enzima é secretada pelos osteoclastos durante o processo de reabsorção óssea e reabsorção radicular, e facilita a identificação de osteoclastos. Os resultados deste estudo mostraram que houve diferença estatisticamente significativa para a contagem de células TRAP positivas no lado de tensão entre os grupos controle e laser aos 9 dias, sendo que houve uma tendência à diminuição deste número ao longo do tempo (FIGs. 14, 15 e 16). Já no lado de compressão, a expressão da TRAP se mostrou mais elevada que no lado de tensão. Quando comparado ao controle, o grupo irradiado com laser de baixa potência mostrou maior número de odontoclastos TRAP positivas em todos os dias estudados, sendo significativo nos dias 3 ($p < 0,05$) e 9 ($p < 0,01$).

FIGURA 14: Contagem do número de osteoclastos positivos a TRAP observados no osso alveolar nos lados de tensão e compressão para os grupos controle e laser nos dias 3, 6 e 9. No lado de tensão, o grupo não irradiado mostrou significativamente menor número de células TRAP positivas que o grupo laser. No lado de compressão, o grupo laser mostrou número significativamente elevado de osteoclastos TRAP positivos aos 6 e 9 dias comparado ao grupo não irradiado. Letras diferentes indicam $p < 0,05$.

FIGURA 15: Fotomicrografias ilustrando a expressão para os marcadores de TRAP positivos no lado de **compressão** (aumento original de 100x). Foram avaliadas a imunorreação positiva a TRAP no ligamento periodontal (LP) e no osso alveolar (OA). Aos 9 dias, há maior expressão de TRAP no grupo laser, quando comparado ao controle. D (dente). As setas apontam para a marcação da expressão de TRAP no parede do osso alveolar próximo ao ligamento periodontal.

FIGURA 16: Fotomicrografias ilustrando a expressão para os marcadores de TRAP positivos no lado de **tensão** (aumento original de 100x). Foram avaliadas a imunorreação positiva a TRAP no ligamento periodontal (LP) e no osso alveolar (OA). Aos 9 dias, há maior expressão de TRAP no grupo laser, quando comparado ao controle. D (dente). As setas apontam para a marcação da expressão de TRAP na parede do osso alveolar próximo ao ligamento periodontal.

Um aumento na imunoreatividade de RANKL positivos no ligamento periodontal e osso alveolar foram observados no lado de compressão, sendo que para o

Um aumento na imunoreatividade de RANKL positivos no ligamento periodontal e osso alveolar foram observados no lado de compressão, sendo que para o grupo laser esta expressão do marcador para atividade de odontoclastos se mostrou significativamente maior quando comparado ao grupo não irradiado aos 9 dias. Para o grupo não irradiado, parece haver uma redução na expressão de RANKL ao longo do tempo, sendo significativa dos dias 3 ao 9 ($p<0,001$) e dos dias 6 ao 9 ($p<0,05$). Para o grupo laser, há uma tendência de aumento desta expressão (não significativa).

No lado de compressão houve uma redução estatisticamente significativa na expressão de OPG positivo no grupo laser, aos 6 dias, comparado ao grupo não irradiado. E ao longo do tempo, o grupo não irradiado mostrou um aumento significativo na expressão de OPG entre os dias 3 e 6 ($p<0,05$), porém uma redução entre os dias 6 e 9. Já o grupo Laser, também mostrou um aumento entre os dias 3 e 6 que se estabilizou no dia 9. No lado de tensão, a expressão de OPG se mostrou maior no grupo Laser aos 6 dias ($p<0,01$), sendo que embora o grupo não irradiado tenha iniciado aos 3 dias com maior expressão de OPG (não significativa) que o grupo Laser, houve uma tendência a redução nesta expressão, enquanto no grupo laser houve um aumento progressivo na expressão de OPG, significativa entre o dias 3 e 6 ($p<0,05$) e 3 e 9 ($p<0,001$) (FIGs.17, 18, 19 e 20).

FIGURA 17: Expressão dos marcadores RANKL e OPG nos grupos laser e controle para os dias 3, 6 e 9. * indica $p < 0,05$.

FIGURA 18: Fotomicrografias de molares de ratos ilustrando a expressão para o marcador RANKL no lado de **compressão** (aumento original de 200x). É possível notar uma maior expressão de RANKL no lado de compressão no dia 9 no grupo laser. As setas apontam para a marcação na expressão do anticorpo RANKL. Ligamento periodontal (LP), osso alveolar (OA) e dente (D).

FIGURA 19: Fotomicrografias de molares de ratos ilustrando a expressão para o marcador OPG positivo no lado de **tensão** (aumento original de 200x). No lado de tensão, há um aumento progressivo na expressão de OPG no lado de tensão para o grupo laser. As setas apontam para a marcação na expressão do anticorpo OPG. Ligamento periodontal (LP), osso alveolar (OA) e dente (D).

FIGURA 20: Fotomicrografias em maior aumento (400x) ilustrando a expressão positiva dos marcadores RANKL e OPG aos 9 dias, no lado de compressão e tensão, respectivamente. Ligamento periodontal (LP), osso alveolar (OA) e dente (D). As setas indicam a marcação na expressão dos anticorpos RANKL e OPG.

Análise Western Blotting

A expressão das proteínas SOFAT foi avaliada em tecido gengival por análise de transferência de *Western Blotting* nos dias 0, 14 e 21 (FIG. 21). Aos 14 dias, os grupos controle e Laser mostraram aumento na expressão das proteínas SOFAT e RANKL. Aos 14 dias, o grupo Laser mostrou maior expressão de RANKL que o grupo não irradiado ($p < 0,001$). Esta diferença na expressão de RANKL não estava presente aos 21 dias. Para a proteína SOFAT, não houve diferença na sua expressão entre os grupos aos 14 dias, sendo que aos 21 dias o grupo Laser mostrou menor expressão de SOFAT comparado ao grupo não irradiado ($p < 0,01$).

FIGURA 21: Expressão das proteínas RANKL e SOFAT presentes no tecido gengival nos dias 0, 14 e 21. *indica $p < 0,05$.

5.3 Efeito do Laser de Baixa Potência na Reabsorção Radicular

Análise Histomorfométrica Descritiva

Nossos resultados mostraram que o grupo onde não foi realizada a movimentação (dia 0) não apresentou lacunas de reabsorções radiculares a nível de cimento e dentina em ambas raízes analisadas. Ambos os grupos Laser e não irradiado em todos os dias analisados mostraram algum grau de reabsorção radicular, sendo que as lacunas eram mais profundas e mais extensas em comprimento no lado de compressão e na raiz distovestibular.

No dia 3, o lado de compressão apresentou pequenas áreas de lacunas de reabsorção radicular no lado de compressão com pouca diferença entre os grupos, porém com comprometimento a nível de dentina no grupo não irradiado, enquanto o grupo Laser apresentou reabsorções radiculares mais superficiais à nível de cimento. As raízes mesial e distal mostraram lacunas de reabsorções maiores no lado de tensão, a nível de cimento, neste dia, sendo maior no grupo não irradiado. Houve aumento no número de odontoclastos na superfície radicular em relação ao dia 0 para o grupo não irradiado, nos lados de tensão e compressão.

Ao dia 6, as lacunas de reabsorções radiculares ainda se apresentavam como pequenas áreas no lado de compressão em ambos os grupos, porém atingindo dentina. Enquanto o lado de tensão, as lacunas eram um pouco maiores, porém mais superficiais, sendo que mostraram-se reduzidas nos grupos irradiados. O número de odontoclastos, em ambos os lados, permaneceu elevado para o grupo não irradiado e reduzido no grupo Laser.

A partir do dia 9 até o dia 21, as lacunas de reabsorções radiculares mostraram-se maiores no lado de compressão da raiz distal, especialmente para o grupo não irradiado. O grupo Laser para os dias 9, 14 e 21 mostrou poucas áreas de reabsorções. O lado de compressão da raiz mesial apresentou grande área em comprimento e profundidade (acomentando dentina) de reabsorção radicular no dia 21 no grupo não irradiado, sendo que o grupo Laser mostrou áreas menos extensas e profundas ao longo do tempo. No lado de tensão, as lacunas foram menores na raiz distal em comparação à raiz mesial, e mais uma vez o Laser mostrou áreas pequenas e mais rasas que o grupo controle em todos os dias. No dia 9, houve uma redução no número de odontoclastos presentes na superfície

radicular no lado de tensão, porém observou-se um aumento no número de odontoclastos em ambos os grupos no lado de compressão, com aumento evidente no grupo não irradiado.

Análise Histomorfométrica Quantitativa

Os resultados da mensuração das áreas de reabsorção radicular obtidas das lâminas histológicas mostraram reduções estatisticamente significantes nas áreas de reabsorção radicular, ($p < 0,05$) para os dias 14 e 21 no lado de tensão da raiz distal e para os dias 6, 9 e 14 dias no lado de tensão da raiz mesial. Nos lados de compressão, foi observada redução significativa para o grupo laser no dia 21 na raiz mesial. Já na raiz distal foram observadas reduções estatisticamente significantes nos dias 9, 14, e 21 (FIGs. 22 e 23).

FIGURA 22: Imagens representativas de área de reabsorção nos grupos controle e laser nos dias 3, 6 e 9. As setas indicam a extensão da reabsorção radicular na raiz distal, lado de compressão. (D – Dente, LP – Ligamento periodontal, OA - osso alveolar). A média das áreas das lacunas de reabsorção no grupo Laser (setas) se mostrou maior do que no grupo não irradiado.

FIGURA 23: Gráfico representativo dos valores de média e desvio padrão do cálculo das áreas totais das lacunas de reabsorção radicular. Letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Análise Imunoistoquímica

Quanto ao número de odontoclastos presentes na superfície radicular, foi observado menor quantidade no grupo laser, tanto no lado de tensão, quanto de compressão, para todos os dias avaliados (FIG. 24). Houve uma tendência a aumento do número de odontoclastos presentes ao longo do tempo para ambos os grupos, porém o grupo não irradiado no lado de compressão, mostrou aumento significativo deste número nos dias 6 e 9 ($p < 0,01$ e $p < 0,001$).

FIGURA 24: Contagem do número odontoclastos positivos a TRAP observados na superfície radicular nos lados de tensão e compressão para os grupos controle e laser nos dias 3, 6 e 9. Letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Os resultados da avaliação semi-quantitativa das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostraram que, para todos os dias, o grupo laser obteve um escore menor, o que significa que as lacunas de reabsorções radiculares encontradas tinham menor extensão e profundidade quando comparadas às do grupo não irradiado. Esta diferença, porém, se mostrou estatisticamente significativa somente para os grupos de 9 dias ($p<0,005$), mostrando que o grupo não irradiado possuía um maior número de raízes classificadas com escore mais elevado, o que significou mais de 1/3 do comprimento da raiz com crateras de reabsorção a nível de cimento e dentina (FIG. 25 e 26).

FIGURA 25: Resultados da avaliação da presença e extensão das lacunas de reabsorção radicular encontradas nas imagens de microscopia eletrônica de varredura das raízes mesio e distovestibulares para os grupos laser e controle para os dias 3, 6 e 9 * indica $p<0,05$.

FIGURA 26: Elétron-micrografias de molares de ratos mostrando lacunas de reabsorções radiculares de maior comprimento e profundidade encontradas nas raízes mesial e distal dos molares no grupo não irradiado aos 9 dias, comparado às lacunas encontradas no grupo laser. As setas indicam as regiões de lacunas de reabsorção radicular (aumento original 60x) e em maior aumento (aumento original 300x).

Microtomografia Computadorizada

Na avaliação volumétrica das lacunas de reabsorções radiculares medidas pela imagens de microtomografias encontramos uma redução significativa do volume (em m^3) no lado de compressão quando somadas ao volume das lacunas encontradas nas raízes mesial e distal no dia 14 (FIG. 27e 28).

O presente estudo utilizou força de 50 g aplicada durante a movimentação dentária, encontrando volume elevado de lacunas de reabsorções radiculares.

FIGURA 27: Imagens de MicroCT em 3D das raízes distais, no lado de compressão, do grupo não irradiado (a) e laser (b). As setas e colchetes indicam as lacunas de reabsorções radiculares.

Na avaliação volumétrica das lacunas de reabsorções radiculares medidas pela imagens de microtomografias encontramos uma redução significativa do volume (em mm^3) no lado de compressão para as raízes mesial e distal, separadamente. O volume total das lacunas de reabsorção radicular para os grupos laser foram menores que o grupo não irradiado, para ambos os dias 14 e 21 e ambos os lados, de tensão e compressão (FIG. 24). Foi encontrada redução nas lacunas de reabsorção radicular significativa para o grupo Laser no lado de tensão para a raiz mesial aos 21 dias e raiz distal aos 14 dias. No lado de compressão, redução significativa foi encontrada no

grupo irradiado, comparado ao grupo não irradiado, na raiz mesial aos 21 dias e na raiz distal em ambos os dias. Foi observado também que entre as duas raízes estudadas, a raiz distal sofreu volumes maiores de reabsorção radicular. Entre os lados de tensão e compressão, o lado de compressão, como previsto, mostrou maiores volumes de reabsorção radicular para ambos os grupos.

FIGURA 28: Gráfico representativo do resultado das mensurações volumétricas das lacunas de reabsorções radiculares nas raízes mesial e distal, comparando os lados de tensão e compressão. Maior volume foi encontrado no lado de compressão, sendo que o grupo não irradiado mostrou aumento significativo em relação ao grupo laser (* indica $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

A movimentação ortodôntica representa um processo inflamatório associado a uma reação dos tecidos de suporte (raiz, ligamento periodontal e osso alveolar) em resposta às forças biomecânicas e leva a um subsequente processo de remodelação óssea, mediada por mecanismos que envolvem os processos de reabsorção e deposição óssea, em lados onde o ligamento periodontal é comprimido e esticado, respectivamente. A neoformação de osso alveolar ocorre no lado de tensão por estímulo de estiramento do ligamento periodontal, enquanto que a reabsorção óssea ocorre no osso alveolar frontal ou à distância no lado de compressão. O uso de forças pesadas gera compressão exagerada dos vasos sanguíneos do ligamento periodontal, com consequente trombose capilar e ausência de oxigênio no local, que leva à morte celular. A necrose local é representada pelo aparecimento de áreas hialinas e reabsorção óssea à distância (8).

A curva de deslocamento pelo tempo da movimentação ortodôntica é classicamente dividida em 3 fases (86) e inclui: fase inicial, uma fase “lag” e uma fase pós-lag. A fase inicial é caracterizada por um rápido movimento imediatamente após a aplicação da força, que está relacionado ao deslocamento do dente no espaço do ligamento periodontal. Imediatamente após a fase inicial, há uma fase chamada “lag” onde ocorre uma taxa relativamente baixa de deslocamento do dente ou nenhuma. Trabalhos sugerem que este atraso ocorre devido à presença de áreas de hialinização (tecido necrótico) do LP, que necessita ser completamente removido antes do início da terceira fase, chamada pós-lag, onde a movimentação gradualmente aumenta. Alguns estudos mostram uma quarta fase, onde há um aumento linear constante do deslocamento dentário. Os resultados deste estudo mostraram que os dois grupos Laser e Controle obtiveram um padrão de curva de deslocamento em relação ao tempo semelhantes. Houve um deslocamento significativo nos primeiros 3 dias da aplicação da força e este deslocamento se manteve acelerado do dia 3 ao dia 6. A partir do dia 6, um aumento menos significativo ocorreu até o dia 9, e a partir do dia 9 até o dia 21, o deslocamento dentário se manteve. Neste estudo não foi possível identificar a fase lag, pois houve diferença significativa entre o dia 0 e dia 3 e dia 3 e dia 6. Kim et al. (2013) não observaram a fase lag na movimentação dentária de cães (87), bem como Yoshida et al. (2009) e Fujita et al. (2008), com aplicação de 10 g para movimentação de molares de ratos (22,29, 90). Gonzales et al. (2009), avaliando

o deslocamento dentário em ratos com aplicações de diferentes quantidades de forças (10g, 25g, 50g e 100g) observaram a fase lag no seu experimento entre os dias 3 e 10 para todos os grupos estudados (43). Entretanto, outros autores, aplicando 50 g de força, não observaram a fase lag de movimentação dentro dos dias 7, 14, 21 e 28 dias (81,89), corroborando nossos achados.

Se compararmos os grupos laser e controle, observou-se maior taxa de movimentação dentária no grupo irradiado com o laser em comparação ao controle a partir do dia 6 e este aumento no deslocamento se manteve sempre superior e constante em relação ao grupo não irradiado nos demais dias. Esta maior movimentação também foi encontrada em outros estudos (22,29,55,65,73) em seus trabalhos experimentais. Torri et al. (2013) e Ge et al. (2014) em seus trabalhos de revisão sistemática, concluíram que a maioria dos estudos reporta efeitos positivos da aplicação do laser de baixa potência para acelerar a movimentação dentária em dentes de animais e humanos (90,91). Em humanos, estudos mostraram aumentos de 20-40% ou aumento na taxa de movimentação em 2 vezes em 6 meses (54,56,59,66). Os resultados deste estudo mostrou um aumento de: 1,46 vezes aos 3 dias (46%), 1,3 vezes aos 6 dias (31%), 1,41 vezes aos 9 dias (42%), 1,44 vezes aos 14 dias (44%) e 1,43 vezes aos 21 dias (43%). Kawasaki e Shimizu (25) encontraram em média um aumento de 1.3 vezes no grupo irradiado com laser e Yoshida et al. (60) encontraram maior taxa de movimentação dentária nos grupos irradiados para todos os dias estudados: dia 3 (1.4 vezes), 7 (1.19 vezes), 14 (1.26 vezes) e 21 (1.34 vezes) comparado ao grupo não irradiado. O estudo de Fujita et al. (29) mostrou um aumento bastante expressivo de até 2.2 vezes no terceiro dia.

Todos os estudos citados foram realizados utilizando-se uma força de 10 g (ou 0,10 N) para movimentação dentária. Shirazi et al. mostraram um aumento de 2.3 vezes após 14 dias de movimentação com aplicação de força de 40 g (ou 0,4 N) (73). Alguns estudos têm sugerido que a força ortodôntica excessiva pode ser um fator crítico para a reabsorção radicular, assim Taddei et al. (92) compararam diferentes protocolos de movimentação dentária induzida em ratos, variando a quantidade de força aplicada (0,10 N, 0,25 N, 0,35 N e 0,50 N) e observou maior grau de movimentação dentária, recrutamento de osteoclastos e presença de reabsorção radicular utilizando a força de 0,50N e por este motivo esta magnitude foi utilizada neste estudo.

Com relação à área de hialinização presente no ligamento periodontal, o estudo de von Böhl et al. (93) demonstraram que dentes submetidos a forças excessivas mostram áreas de hialinização mais frequentemente do que os dentes que experimentam forças leves. Assim, os autores observaram que o desenvolvimento de zonas de hialinização tem uma relação definida com a magnitude de força. Porém, não foi constatada relação entre a extensão e presença das áreas de hialinização com a taxa de movimentação dentária. Os autores sugeriram que uma vez que o processo de remodelação se inicia, ele prossegue dentro de uma certa proporção, independente da quantidade de força aplicada. O presente estudo, mensurando as áreas de hialinização, observou que as áreas estão presentes em maior extensão nos primeiros 3 dias, e se reduzem com o tempo. Nenhuma área de hialinização foi notada a partir dos 14 dias. A importância das áreas de hialinização será novamente discutida mais à frente, no processo de reabsorção radicular.

Contrariamente, muitos estudos mostram não haver diferença significativa na taxa de movimentação dentária com e sem irradiação laser de baixa potência em trabalhos experimentais (61,64,68). Um aspecto importante e difícil é a definição da dose ou densidade de energia ótima para promover a aceleração da movimentação dentária. Uma vez que o laser de baixa potência possui efeito biomodulador, alta densidade de energia poderia reduzir o efeito bioestimulador e portanto inibir a atividade celular local, gerando um efeito bioinibitório nos tecidos irradiados, resultando em diminuição e/ou nenhum efeito na movimentação dentária. Estudos encontrados na literatura possuem grande diversidade na densidade de energia e/ou energia/ponto utilizada. Alguns estudos que não encontraram diferenças significantes na movimentação dentária, utilizaram densidades de energias de $41,4 \text{ J/cm}^2$ por ponto (4 pontos ao total) e energia total de 5,2J (61), $229,3 \text{ J/cm}^2$ por ponto (total de 3 pontos) e energia total 7,2J (64), $343,9 \text{ J/cm}^2$ por ponto (total de 3 pontos) e 54J (68). E estudos que mostraram aumento na quantidade de movimentação dentária também mostraram grande variação, sendo que alguns utilizaram $4824,4 \text{ J/cm}^2$ e energia total de 54J (29,57,60) e outros $7,5 \text{ J/cm}^2$ e energia de 7,5J (73) ou $3,6 \text{ J/cm}^2$ e energia 2,16J (65).

Mais recentemente, Carvalho-Lobato et al. (94) relataram que a irradiação com laser de baixa potência tem um efeito acumulativo, isto quer dizer que parte da dose administrada pode acumular na próxima irradiação. Assim, recomendaram que cuidados devem ser tomados para não haver excesso da dose bioestimulante,

alcançando a dose de inibição. Mesmo havendo uma grande possibilidade de combinações da irradiação na literatura e diferentes protocolos de aplicação, estudos recomendam o uso de uma energia total e densidade de energias baixas para produzir efeitos bioestimuladores desejáveis (55, 91). O presente estudo utilizou uma densidade de energia de 75 J/cm^2 por ponto, e com energia total de 3J, similar aos estudos de Duan et al. e Shirazi et al. (65,73). Além disso, para evitar que o efeito cumulativo causasse inibição da movimentação dentária, a irradiação foi realizada em dias alternados para todos os grupos.

Este estudo utilizou a movimentação ortodôntica induzida em ratos e avaliou o efeito do laser de baixa potência sobre o metabolismo ósseo e remodelação óssea. Uma força controlada foi aplicada ao primeiro molar utilizando uma mola de NiTi para criar uma área de compressão no osso adjacente na direção força e uma área de tensão no lado oposto. Não foi utilizado o lado contra-lateral como grupo não irradiado, evitando assim um possível efeito sistêmico do laser. O efeito sistêmico do laser permanece controverso na literatura. Rodrigo et al. e Coelho et al. mostraram evidências de efeito sistêmico em cicatrização de ferida e reparo ósseo, no sistema nervoso, e em queimaduras (95,96). Porém, recentemente, Shirazi et al. demonstrou que durante a movimentação dos primeiros molares superiores de ratos em ambos os lados e somente irradiação com LPB em um dos lados (grupo com irradiação direta), sendo o outro lado denominado irradiação indireta (73). Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa na movimentação dentária e no número de osteoclastos entre os grupos irradiados indiretamente e o grupo não irradiado.

Forças ortodônticas controladas iniciam um evento inflamatório causando compressão no local de constrição da microvasculatura do ligamento periodontal. Os tecidos ao redor da área comprimida começam a liberar mediadores químicos, como interleucinas, prostaglandinas (10,39) bem como o sistema de RANK-RANKL (receptor ativador do fator nuclear kappa B/ ligante do receptor do fator nuclear kappa B) e OPG (Osteoprotegerina) (2). O papel de RANKL, em conjunto com uma outra proteína ligante muito importante, M-CSF (que se liga ao seu receptor c-fms), é promover a formação de osteoclastos, a fusão, a diferenciação, ativação e a sobrevivência, aumentando assim a reabsorção óssea. Estas células produzem a reabsorção do ligamento periodontal próximo, osso alveolar e em alguns casos, parcialmente, a camada de cemento a partir da raiz, permitindo espaço para o

deslocamento dentário. A osteoprotegrina (OPG) secretada pelas células de linhagem osteoblásticas, é um fator que ocorre naturalmente e que antagoniza os efeitos de RANKL. Estes ligantes também parecem ser os reguladores-chave da remodelação óssea durante a movimentação ortodôntica (51,97). Durante o movimento ortodôntico, no lado de compressão, a expressão de RANKL é induzida, e em contraste, no lado de tensão do ligamento periodontal, há um aumento na síntese de OPG.

Durante a movimentação dentária induzida, como visto anteriormente, fases distintas são observadas. Cada fase é determinada por reações específicas envolvendo o recrutamento de osteoblastos e células precursoras de osteoclastos bem como o extravasamento e quimiotaxia de células inflamatórias (52). Os resultados deste estudo mostraram que aos 3 dias, a expressão de RANKL no lado de compressão para o grupo Laser se mostrou significativamente mais elevada que no grupo não irradiado e houve uma tendência a aumento da expressão de RANKL ao longo do tempo. Já no grupo não irradiado, a expressão de RANKL se mostrou menor que do grupo Laser para todos os dias estudados (dias 3, 6 e 9) e, embora tenha havido um pequeno aumento no dia 6 e uma leve redução no dia 9, esta expressão de RANKL se manteve constante. Assim, conforme esperado, os resultados do presente estudo observou um aumento na expressão de RANKL no lado de compressão nos grupos controle e Laser em comparação ao lado de tensão, corroborando com os achados da literatura mostrando o efeito do laser de baixa potência no estímulo da proliferação celular e na diferenciação das células formadoras de nódulos ósseos da linhagem dos osteoblastos, especialmente em precursores, resultando em um aumento no número de células osteoblásticas diferenciadas bem como na formação óssea (27) e a diferenciação e ativação de osteoclastos via aumento no número de células que mostraram imunorreações positivas para os anticorpos primários do RANKL e RANK no grupo irradiado (29).

Para avaliação dos osteoclastos ativos, marcações da fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP), uma enzima secretada pelos osteoclastos durante o processo de reabsorção óssea foram realizadas. Quando observada a contagem do número de osteoclastos ativos no osso alveolar próximo ao ligamento periodontal, observa-se um aumento significativo no grupo irradiado já no primeiro dia avaliado, dia 3 e com tendência a se manter elevado em comparação ao grupo não irradiado. No dia 6, ambos os grupos possuem número elevado de osteoclastos na região e no dia 9,

observa-se uma queda deste número para o grupo não irradiado. Outros trabalhos observaram os mesmos resultados de aumento na expressão de RANK-RANKL no ligamento periodontal com irradiação do laser de baixa potência durante a movimentação ortodôntica, e identificaram um maior número de osteoclastos presentes identificados por marcação da enzima TRAP (34,68).

Embora estes estudos tenham relacionado o aumento na expressão de RANKL, com a contagem de osteoclastos por TRAP, e com o aumento na quantidade de movimentação dentária, estes estudos falharam em demonstrar, por meio de mensuração, a alteração morfológica do osso alveolar presente e, também, as mudanças tridimensionais do osso trabecular como resultado deste aumento na osteoclastogênese ativada pelo laser de baixa potência. O presente estudo quantificou histomorfometricamente a quantidade de osso alveolar presente no lado de compressão dos grupos controle e Laser e mostrou que a quantidade de osso alveolar presente no dia 3 era semelhante para ambos os grupos e menores do que o inicial (dia 0). Já no dia 6, foi observada uma redução significativa no osso alveolar presente para o grupo irradiado, esta redução se manteve no dia 9 e dia 14, comparado ao grupo não irradiado. No dia 21, não foi observada diferença entre os dois grupos estudados. Ao longo do tempo, foi possível verificar uma tendência à redução do osso alveolar presente do dia 3 ao dia 9, e em seguida um aumento significativo nos dias 14 e 21. Ambos os grupos tiveram a menor área mensurada de osso alveolar presente no dia 9, o que corrobora com os achados de maior número de osteoclastos (TRAP positivos) encontrados neste mesmo dia. Com os achados histomorfométricos, foi possível relacionar de maneira positiva a redução na quantidade de osso alveolar presente no lado de compressão com a maior expressão de RANKL e maior número de osteoclastos presentes nos dias 3, 6 e 9 para os grupos irradiados, em comparação aos grupos controles.

Dentro do sistema RANK-RANKL-OPG a osteoprotegrina (OPG) é uma proteína solúvel, cuja principal função da OPG é agir inibindo a diferenciação osteoclástica, inibindo a função resorptiva dos osteoclastos e estimulando a apoptose dos osteoclastos, assim preservando a integridade óssea. O presente estudo mostrou que no lado de tensão, o laser de baixa potência foi capaz de aumentar a expressão da proteína OPG nos dias 6 e 9, sendo significativo em relação ao grupo não irradiado no dia 9. Kim et al. (28) mostraram um aumento no grau de expressão de OPG na maioria dos dias estudados (1, 3, 7, 14, 30), exceto pelo dia 21, após irradiação de

implante dentário de titânio em ratos e sugeriu que a aplicação do laser pode influenciar de maneira positiva a densidade óssea, mostrando uma matriz óssea mais calcificada pela análise histomorfométrica. Xu et al. demonstrou um aumento na expressão de OPG em culturas de células irradiadas com laser de baixa potência pulsátil, mostrando que o laser pode agir diretamente na proliferação de osteoblastos e sua diferenciação, e indiretamente inibindo a diferenciação de osteoclastos (98) e Saito et al., observaram uma tendência a aumento da imunomarcagem de OPG comparada à marcação de RANK, demonstrando melhor processo de reparo no grupo irradiado (99). Poucos estudos avaliaram a alteração na concentração de OPG durante a movimentação dentária, em especial com ênfase no lado de tensão do ligamento periodontal. Altan et al. (100) e Fujita et al. (29) não encontraram diferenças significativas na imunorreatividade de OPG.

No lado de tensão, embora houvesse um aumento na expressão de OPG no dia 6, observou-se um maior número de osteoclastos TRAP-positivos no grupo irradiado. Esta quantidade foi significativamente reduzida no dia 9 para ambos os grupos, sendo que o grupo irradiado mostrou consideravelmente maior número de osteoclastos. Assim, embora a marcação imunoistoquímica mostrasse uma quantidade elevada de OPG aos 6 e 9 dias, ainda havia uma grande quantidade de osteoclastos TRAP-positivos, levando à redução na área de osso alveolar presente no lado de tensão no grupo irradiado que o grupo não irradiado nestes dias. Este aumento no número de osteoclastos presentes pode ser apontado como consequência do maior deslocamento dentário no grupo laser. Somente a partir do dia 14 que o laser mostrou aumento na área de osso alveolar presente no lado de tensão comparado ao controle, e este aumento se manteve no dia 21. Pompermaier et al. (2008) mostraram que existe uma expressão concomitante de potenciais quimioatraentes de osteoclastos em ambos os lados de compressão e tensão durante a movimentação dentária, sendo que no lado de tensão de maneira menos extensa (101).

No lado de compressão, os resultados deste estudo mostraram que o grupo laser apresentou uma menor quantidade na expressão de OPG em todos os dias avaliados pela imunohistoquímica, porém foi capaz de reduzir a expressão de OPG de maneira significativa nos dias 6 e 9. Esta redução contribuiu de maneira a estimular a atividade osteoclástica. Estudo demonstraram que o aumento na quantidade de OPG local, potencialmente reduz o número de osteoclastos na parede do osso alveolar e pode inibir o deslocamento dentário de maneira considerável (40).

Com relação a respostas celulares ao estímulo do laser de baixa potência, diversos estudos mostraram aumento no número de osteoclastos nos grupos irradiados, comparado ao controle utilizando-se diversas densidades de energia e energia por ponto, variando de $3,6\text{J}/\text{cm}^2$ e energia total de $2,16\text{J}$ (65) a $4821,4\text{J}/\text{cm}^2$ e energia de $54\text{J}/\text{ponto}$ e $25,6\text{J}/\text{cm}^2$ (29,57,64,102). Marquezan et al. (102) obtiveram diferentes respostas na contagem do número de osteoclastos quando a irradiação foi feita diariamente em comparação diariamente. No dia 7, o grupo irradiado diariamente mostrou diminuição do número de osteoclastos enquanto o grupo irradiado a cada 24 h demonstrou aumento na produção de osteoclastos. O presente trabalho utilizou uma densidade de energia de $75\text{J}/\text{cm}^2$ por ponto, e com energia total de 3J , similar aos estudos de Duan et al. e Shirazi et al. (65,73), em dias alternados para todos os grupos irradiados.

Um outro marcador da atividade das células clásticas é o fator osteoclastogênico secretado por células T ativas (SOFAT) que tem o potencial para induzir a osteoclastogênese de maneira independente ao sistema RANKL e têm sido associado ao metabolismo de tecidos ósseos (35). Ainda não há estudos na literatura que relacionam esta citocina à movimentação dentária induzida, porém, um estudo recentemente publicado demonstrou que as células T têm papel importante durante a movimentação dentária induzida (36). Nosso estudo quantificou a concentração da citocina SOFAT nos tecidos gengivais após a movimentação ortodôntica nos dias 14 e 21 comparado ao controle negativo (sem movimentação – dia 0) e observou aumento nesta concentração no dia 21 para ambos os grupos, com aumento significativo maior no grupo não irradiado. Quando comparada à concentração de RANKL presente nos mesmos tecidos gengivais, foi notado um aumento na concentração desta proteína ao longo do tempo, com uma diferença significativa entre os dois grupos estudados no dia 14. Assim, o laser de baixa potência parece agir no sistema RANK-RANKL, aumentando o nível de RANKL presente até o dia 14.

Atualmente há poucos estudos a respeito da participação das células T na movimentação ortodôntica, em um destes, Yan et al. observaram uma diminuição significativa do fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) e interferon-gama ($\text{IFN} - \gamma$), citocinas provenientes das células T auxiliares tipo I em animais imunossuprimidos, reduzindo a movimentação dentária, por diminuição do número de osteoclastos TRAP-positivos e portanto, inibição da osteoclastogênese (36). Nossos resultados mostraram uma maior expressão da citocina SOFAT (responsável pela indução de

osteoclastogênese) no dia 14 no grupo irradiado, porém mostrou-se menor no grupo Laser aos 21 dias. Possivelmente o laser pode ter agido aos 21 dias, reduzindo o processo inflamatório presente neste estágio, inibindo a osteoclastogênese ou estimulando o reparo ósseo (103,104). Mais estudos são recomendados para quantificar a expressão da proteína SOFAT na fase inicial da movimentação dentária.

O uso da Micro-CT permite avaliação da microarquitetura do osso trabecular, permitindo medições tais como, volume total e volume ósseo de uma região (cálculo de proporções entre volume ósseo e o volume total – BV/TV), análise da superfície de uma região específica, densidade da superfície óssea, cálculo de número de trabéculas, espessura das trabéculas, e a região de separação entre as trabéculas, porosidade, entre outras (105). Em 2008, Gonzales et al. utilizaram imagens de microtomografias computadorizadas (MicroCT) para avaliar a mudança no ligamento periodontal e a movimentação dentária, por meio de medidas angulares e lineares, durante a aplicação de forças de diferentes magnitudes (89). O estudo não observou alterações no trabeculado ósseo. Somente em 2011, Zhuang et al. mostraram que a movimentação ortodôntica é capaz de mudar o osso alveolar trabecular, deixando-o mais denso após 14 dias de movimentação dentária (45). Com relação à metodologia empregada no presente estudo, optou-se por avaliar uma região mais extensa de osso alveolar, localizada especialmente nos terços coronal e médio das raízes, fazendo distinção entre lados de compressão e tensão e buscando uma região que representasse as maiores alterações do osso alveolar durante a movimentação ortodôntica, similar aos de Yoshida et al. (22). Os terços selecionados estavam no osso alveolar presente entre as cinco raízes e foram escolhidos com base no estudo de Gonzales et al. (43) que demonstraram maior concentração de forças do primeiro molar superior do rato nesta região, percebido pelo estresse elevado na análise de elemento finito, e possivelmente um processo de remodelação intenso. E os dias 14 e 21 foram escolhidos baseados na literatura que encontraram maior alteração da microestrutura do osso alveolar a partir de 14 dias. Estudos anteriores utilizaram para análise em MicroCT um volume de osso no formato de cubos de 300 µm ou 700 µm localizados somente no lado distal do terço apical da raiz mesial do primeiro molar superior do rato, distantes da superfície da raiz dentária (45).

Na literatura há uma escassez de estudos que avaliaram os efeitos do laser de baixa potência no trabeculado ósseo de maneira volumétrica. Os nossos resultados mostraram que a densidade mineral óssea (BMD) foi significativamente menor no

grupo do laser quando comparado com o controle tanto aos 14 dias quanto aos 21 dias, sendo que houve uma tendência a diminuição da BMD com o tempo em ambos os grupos. Yoshida et al. demonstraram uma redução na densidade óssea mineral no grupo irradiado em comparação ao controle nos dias 7, 14 e 21 (22). Vieira et al. (2015) observaram uma menor densidade mineral óssea a medida que o dente se movimentava (106). Estes fenômenos metabólicos, celulares e teciduais mais ativos no grupo irradiado ocorridos nos primeiros dias da movimentação (3, 6 e 9), levou a um trabeculado ósseo menos denso, menos espesso e mais espaçado, favorecendo a movimentação ortodôntica observado nos dados obtidos pela microtomografia computadorizada especialmente aos 14 dias. Aos 21 dias, pouca diferença no tecido ósseo foi observado entre os grupos controle e laser, exceto pelo aumento da espessura do trabeculado ósseo.

Em relação a fração volume de osso/volume total (BV/TV), o grupo laser mostrou menor porcentagem de volume ósseo aos 14 dias, mas não houve diferença entre os grupos aos 21 dias. O grupo laser mostrou significativamente menor espessura trabecular em relação ao controle no lado de compressão aos 14 dias, porém aos 21 dias, o grupo Laser mostrou aumento significativo da espessura das trabéculas. Maior quantidade de separação das trabéculas foram encontradas no grupo laser para os dias 14 e 21 ($p < 0,05$). Todos os dados sugerem maior atividade de osteoclastos no lado de compressão no grupo laser aos 14 dias, porém pouca diferença foi encontrada aos 21 dias (v). Yasav et al. e Murphy et al. observaram uma redução da BV/TV quando o osso alveolar total presente entre as raízes dos molares (sem distinção dos lados de compressão e tensão) foi avaliado, além de uma diminuição na densidade óssea (84,107). Zhuang et al. observaram um aumento na fração BV/TV para os dentes movimentados comparados aos dentes não movimentados, além de um menor espaço entre as trabéculas (45). Ru et al. (108) encontraram uma redução em BV/TV, espessura das trabéculas (Tb.Th) e espaços entre as trabéculas no lado de compressão entre os dias 3 e 7, sendo que todos os parâmetros estavam aumentados no lado de tensão.

As mudanças tridimensionais do osso alveolar no lado de tensão mostraram maior densidade óssea mineral aos 14 dias no grupo irradiado e maior fração de volume nos dias 14 e 21. Foi encontrada maior espessura das trabéculas, significativa, no grupo laser aos 21 dias, assim como menor espaço entre as trabéculas no lado de tensão. Kim et al. observou que o laser de baixa potência pode agir

aumentando significativamente a densidade óssea mineral, a espessura das trabéculas, e o número de trabéculas, porém, não houve aumento na fração BV/TV na movimentação dentária de dentes na presença de defeito ósseos preenchidos com enxerto em grupos com e sem irradiação (109). Poucos estudos avaliam o efeito do laser de baixa potência no processo de reabsorção óssea durante a movimentação dentária induzida. Hayashi et al. (110) e Yoshida et al. (22) encontraram um aumento na densidade óssea mineral durante a movimentação dentária com aplicação do laser de baixa potência. O estudo de Romão et al. mostraram que a irradiação com laser de baixa potência no osso alveolar pode aumentar a fração BV/TV, o número de trabéculas e diminuir a separação entre elas durante reparo ósseo após extração dentária (111).

Concomitantemente à reabsorção óssea, após aplicação de força pesada para a movimentação ortodôntica, pode haver reabsorção radicular associada. Esta reabsorção radicular é ocasionada pela morte dos cementoblastos, cuja função é revestir e proteger a superfície radicular de reabsorções radiculares indesejadas. Mediante a isso, a superfície radicular fica desnuda e exposta à ação das células clásticas que respondem aos mediadores da reabsorção atacando a superfície dentinária (112).

O presente estudo avaliou por meio de análise imunoistoquímica o efeito do laser de baixa potência, durante este processo de reabsorção e mostrou que houve uma redução na área de lacunas de reabsorção radicular demonstrada histomorfometricamente nas raízes mesial e distal, nos lados de tensão e compressão. Redução significativa foi vista nos lados de compressão da raiz distal nos dias 9, 14 e 21 e na raiz mesial no dia 21 para o grupo Laser em comparação ao controle. A literatura é escassa relacionando os efeitos do laser de baixa potência na redução do processo de reabsorção radicular. Seifi et al. (79) demonstraram redução nas áreas de reabsorção no grupo irradiado com laser de baixa potência durante movimentação dentária após indução de uma perda óssea seguido de colocação de enxerto de osso sintético. Outro estudo relatou aplicação de LED com 618 nm de comprimento de onda e observaram redução de reabsorções radiculares durante movimentação dentária induzida (77). Além disso, de acordo com o estudo de Altan et al. (68), o laser de baixa potência pode ter um efeito reparador nas áreas de reabsorções radiculares promovidas pelo movimento ortodôntico, aumentando o número de osteoblastos e fibroblastos a longo prazo após 14 dias cessada a movimentação.

Contrariamente, a redução das lacunas de reabsorção radicular durante a movimentação dentária não foi observada no trabalho de Han et al. em dentes de cães corticotomizados (113). O grupo laser mostrou mais células TRAP-positivas no lado de compressão, com lacunas de reabsorções radiculares mais pronunciadas, bem como áreas de hialinização. Achados similares foram encontrados por Kim et al. (109) que observaram maior quantidade de reabsorção radicular e maior número de odontoclastos na superfície radicular, no grupo laser 2 semanas após a movimentação dentária, em cães, após promoção de defeito ósseo com colocação de enxerto.

Atualmente, estudos têm sido realizados utilizando imagens de microtomografia computadorizada para quantificação volumétrica das lacunas de reabsorção radicular (83,84). Na avaliação volumétrica das lacunas de reabsorções radiculares medidas pela imagens de microtomografia observou-se uma redução significativa do volume no lado de compressão quando somados os volumes das lacunas encontradas na raiz distal aos 14 dias no lado de tensão e aos 14 e 21 dias no lado de compressão. Houve redução significativa do volume de reabsorção radicular na raiz mesial significativa aos 21 dias em ambos os lados. A raiz distal mostrou maior volume de lacunas de reabsorção radicular por apresentar volume radicular menor e portanto tendência a uma concentração maior da força aplicada. A raiz mesial distribui melhor esta força aplicada por possuir volume total maior de raiz. Houve uma tendência a aumento das lacunas de reabsorção radicular no grupo não irradiado de 14 para 21 dias e uma manutenção deste volume para o grupo laser.

Um aspecto importante no uso da microCT é a resolução das imagens da microtomografias durante a aquisição feita pelo tomógrafo. A resolução utilizada no presente estudo foi de 5 μm (dado pelo tamanho do voxel – unidade volumétrica do escaneamento), considerada alta resolução e portanto promovendo uma maior definição da imagem. Ru et al. (108) obtiveram imagens com resolução de 9 μm e Murphy et al. (84) utilizaram 16 μm . Bouxen et al. sugeriram que ao analisar estruturas menores, o tamanho do voxel pode influenciar de maneira significativa os resultados. A digitalização com baixa resolução (voxel de tamanho grande em relação ao tamanho da estrutura de interesse) pode causar um erro na mensuração. Baixa resolução, embora proporcione um tempo de aquisição da imagem mais curto, pode acarretar em baixa qualidade da imagem, aumentando a possibilidade de erros nas mensurações. A alta resolução (pequeno tamanho de voxel), como a utilizada neste estudo, melhora a qualidade da imagem e aumenta a precisão das medidas (105).

O presente estudo utilizou de força de 50 g aplicada durante a movimentação dentária, encontrando volume elevado de lacunas de reabsorções radiculares. Outros estudos também correlacionaram a força elevada de 30 g (45) até 100 g (108), com aumento no volume de lacunas de reabsorções radiculares presentes após movimentação dentária (53,77,89).

Quando analisadas as expressões de RANKL e OPG no ligamento periodontal, o grupo Laser mostrou maior expressão de RANKL e menor expressão de OPG no lado de compressão que o controle, resultando em menor número de osteoclastos TRAP-positivos observados na superfície radicular. Nossos resultados foram opostos aos encontrados por Tyrovola et al., que sugeriram que esta proporção RANKL-OPG nas células do ligamento periodontal, também contribui para a reabsorção radicular durante a movimentação dentária ortodôntica. Os autores relataram que as células do ligamento periodontal comprimido em casos de reabsorção radicular externa podem produzir uma grande quantidade de RANKL e regular, por aumento, a osteoclastogênese (33). Isso explica o maior aumento de RANKL e a diminuição de OPG nos casos de reabsorção radicular severa, onde a concentração inicial de RANKL estava muito elevada e a concentração de OPG diminuída, no grupo com severa reabsorção radicular quando comparado ao grupo que apresentava menos reabsorções radiculares. O referido estudo mediu os níveis de RANKL e OPG no fluido gengival crevicular e no soro sanguíneo. Outros estudos também encontraram forte correlação entre a expressão da taxa de RANKL com a presença de reabsorção radicular em ratos submetidos a movimentação dentária, e que níveis elevados de RANKL pode ser um fator de prognóstico do grau de reabsorção radicular (31,32,75). Yamaguchi et al. mediram os níveis de RANKL e OPG a partir de coletas de células do ligamento periodontal de pré-molares movimentados e extraídos (31). Já Low et al. usaram quantificação por PCR (reação em cadeia de polimerase) de amostras de tecidos ósseo, radicular e do ligamento periodontal no lado de compressão da raiz, que foram homogeneizadas após 14 dias de movimentação dentária com forças pesada (32) e Seifi et al. também utilizaram método semelhante (PCR-RT) para quantificação de RANKL presente e o material coletado para exame foi raspado de locais onde havia lacunas de reabsorção radiculares severas com uso de uma broca diamantada (75). Não houve distinção entre os lados de compressão e tensão nestes estudos.

Diversos estudos também têm utilizado o método imunoistoquímico para a análise de área de reabsorção radicular. Nakano et al. demonstraram que na aplicação de 50 g de força, houve um aumento da imunorreatividade para RANKL/RANK aos 7 e 10 dias, e considerou que o aumento nesta proteína presente no ligamento periodontal e achados de maior número de odontoclastos TRAP-positivos na superfície radicular, podem estar envolvidos no processo de reabsorção radicular quando do uso de força pesada (114). Zhou et al. também demonstraram aumentos na expressão de RANKL no lado de compressão em dentes movimentados com aplicação de força de 100 g e aumento de OPG no lado de tensão (115). Os aumentos na expressão de RANKL no lado de compressão foi associada ao aumento no número de odontoclastos e à severa reabsorção radicular.

Nossos resultados mostraram que o laser de baixa potência agiu reduzindo o processo de reabsorção radicular, mesmo na presença de níveis elevados de RANKL no ligamento periodontal, quando comparado ao controle. Contudo, nossos resultados mostraram uma redução no número de células clásticas TRAP-positivas na superfície da raiz dentária nos grupos irradiados com laser de baixa potência para todos os dias, em ambos os lados de compressão e tensão, porém, de maneira significativa no lado de compressão nos dias 6 e 9. A análise histomorfométrica mostrou maior integridade na camada de cemento da superfície radicular no lado de compressão para todos os dias estudados, exceto dia 6 da raiz distal, embora na análise imunoistoquímica tenha mostrado um aumento na expressão de RANKL e diminuição da expressão de OPG no ligamento periodontal no grupo laser. Nossos resultados se mostraram mais similares aos resultados encontrados por Inubushi et al que observaram que estímulo com ultrassom (LIPUS) agiu acelerando a movimentação dentária na segunda semana e reduzindo significativamente a reabsorção radicular (81). O estudo constatou que o número de osteoclastos (TRAP-positivos) aumentou no grupo LIPUS, porém o número de odontoclastos/cementoclastos diminuiu. Esta expressão foi dada pela parte experimental in vitro do estudo que demonstrou que o LIPUS aumentou a expressão de RANKL em osteoblastos e cementoblastos e aumentou a expressão de OPG apenas em cementoblastos, sugerindo que o estímulo promoveu a osteoclastogênese, porém não a cementoclastogênese. Fonseca et al. mostraram, por meio de análise unicamente histomorfométrica, redução no número de células clásticas na superfície radicular, maior número de células inflamatórias (dado pela presença de células polimorfonucleares, especialmente neutrófilos e linfócitos), aumento na densidade de

capilares sanguíneos e pequenos vasos sanguíneos e maior quantidade de fibroblastos no grupo irradiado com LED (irradiação nos dias 2, 3 e 4), após 7 dias (78). O estudo aplicou 50 g de força e não comentou a taxa de movimentação dentária nos diferentes grupos.

Assim, embora os mecanismos celulares de reabsorção radicular sejam bastante semelhantes aos da reabsorção óssea, o processo de reabsorção radicular parece estar dependente da integridade da camada de cemento durante a movimentação dentária, mesmo com aplicação de forças pesadas. Nossos resultados sugerem que o laser de baixa potência estimula a chegada de osteoclastos, conforme observado pelo número significativamente aumentado de células TRAP-positivas na parede do osso alveolar no lado de compressão, via aumento na expressão de RANKL e redução na expressão de OPG nos primeiros 3 dias e se mantendo nos dias 6 e 9. Esta alta atividade de reabsorção óssea induziu a uma menor formação de áreas hialinizadas (também denominada área de necrose asséptica) no lado de compressão. Redução nas áreas de hialinização foram observadas no presente estudo nos dias 3, 6 e 9, entretanto, Habib et al. observou aumento nas áreas de hialinização no grupo irradiado no dia 7, porém uma redução significativa no dia 13 foi observada (67).

Já foi constatada na literatura que a presença de áreas hialinizadas no ligamento periodontal precede a reabsorção radicular durante a movimentação ortodôntica (116,117). De acordo com Brezniak & Wasserstein (112), a reabsorção radicular é uma forma patológica de reabsorção relacionada às áreas hialinas do ligamento periodontal após a aplicação de forças ortodônticas que ocorre durante a remoção da área hialinizada por células gigantes multinucleadas similares a macrófagos (118). Esta remoção expõe a superfície radicular cuja camada cementoblástica foi danificada. Durante este processo, é possível que nova força ortodôntica seja aplicada, interrompendo o processo de reparo existente neste momento, vindo das margens periféricas da camada cementoblástica (8). Assim, é possível que o laser tenha agido preservando a camada cementoblástica (119,120) reduzindo, portanto, a extensão da área e volume das lacunas de reabsorção radicular. De acordo com Chung et al. (121), há uma forte evidência que o laser de baixa potência age na mitocôndria, com intuito de aumentar a produção de adenosina trifosfato (ATP), modular as espécies reativas de oxigênio (ROS) e aumentar a quantidade de óxido nítrico (NO). É conhecido que o óxido nítrico possui participação na movimentação ortodôntica, interferindo positivamente na quantidade de

osteoclastos e vascularização capilar (122,123). O óxido nítrico (NO) tem sido relacionado com o aumento da permeabilidade vascular e tem seu papel nos estágios iniciais da remodelação óssea, influenciando na chegada de monócitos pelos vasos sanguíneos na área estimulada (124). Shirazi et al. demonstraram que a injeção de precursores de óxido nítrico levaram a um aumento no número de osteoclastos, porém, induziram menos reabsorções radiculares observadas por microscopia eletrônica de varredura (125). Em nosso trabalho, a presença de um estágio de hipóxia temporária pode ter estimulado a expressão de OPG que sugere uma inibição da cementoclastogênese e, portanto, agiu protegendo a superfície radicular contra a reabsorção da camada de cimento. De fato, aqueles autores citaram que uma hipóxia mantida por longo período pode agir inibindo a função dos cementoblastos. O papel do óxido nítrico e seu aumento promovido pela ação do laser de baixa potência durante a compressão do ligamento periodontal, e sua relação com o processo de reabsorção radicular necessita de mais estudos.

Além disso, muitos fatores de transcriptase são regulados pelas mudanças no estado redox da célula, ativando diversas vias de sinalização intracelular. O laser de baixa potência não apenas melhora a atividade mitocondrial, mas tem potencial para ativar vias de sinalização tal como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), por meio da geração de ROS (126). A ativação do NF- κ B é essencial para a formação do indutor de osteoclastos, o ligante do receptor RANKL. Assim, o NF- κ B participa diretamente na formação de células gigantes induzidas por RANKL (127,128). O presente estudo observou que o laser de baixa potência agiu diretamente sobre o sistema RANKL, promovendo a diferenciação e ativação de osteoclastos (TRAP-positivos) aumentando a reabsorção óssea no lado de compressão. O aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio local provavelmente influencia a diferenciação e chegada de osteoclastos, com consequente aumento da reabsorção óssea, levando a uma mais rápida dissipação de forças sobre a superfície da raiz, reduzindo as áreas de necrose celular (áreas de hialinização).

7. CONCLUSÃO

O presente estudo concluiu que o laser de baixa potência foi capaz de estimular o processo de remodelação óssea, acelerando a movimentação dentária em murinos. O laser de baixa potência estimulou a reabsorção óssea pelo aumento da atividade dos osteoclastos no lado da compressão e teve um efeito positivo sobre a neoformação de osso no lado de tensão. Além disso, o laser agiu de maneira a inibir o processo de reabsorção radicular, preservando a camada de cementoblastos e, consequentemente, reduzindo os danos na superfície radicular mesmo na presença de alta atividade de reabsortiva no tecido ósseo.

Referências

- 1 Meikle, M.C. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. **The European Journal of Orthodontics**, v. 28, n. 3, p. 221–240, 2005.
- 2 Tyrovola, J.B.; Spyropoulos, M.N.; et al. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. **Journal of oral science**, v. 50, n. 4, p. 367–376, 2008.
- 3 Levander, E.; Malmgren, O.; et al. Evaluation of root resorption in relation to two orthodontic treatment regimes. A clinical experimental study. **European journal of orthodontics**, v. 16, n. 3, p. 223–8, 1994.
- 4 Artun, J.; Smale, I.; et al. Apical root resorption six and 12 months after initiation of fixed orthodontic appliance therapy. **The Angle orthodontist**, v. 75, n. 6, p. 919–26, 2005.
- 5 Sameshima, G.T.; Sinclair, P.M. Predicting and preventing root resorption: Part II. Treatment factors. **American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics**, v. 119, n. 5, p. 511–5, 2001.
- 6 Sameshima, G.T.; Sinclair, P.M. Predicting and preventing root resorption: Part I. Diagnostic factors. **American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics**, v. 119, n. 5, p. 505–10, 2001.
- 7 Talic, N.F.; Evans, C.; et al. Inhibition of orthodontically induced root resorption with echistatin, an RGD-containing peptide. **American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics**, v. 129, n. 2, p. 252–60, 2006.
- 8 Brezniak, N.; Wasserstein, A. Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part I: The basic science aspects. **The Angle orthodontist**, v. 72, n. 2, p. 175–9, 2002.
- 9 Igarashi, K.; Adachi, H.; et al. Inhibitory effect of the topical administration of a bisphosphonate (risedronate) on root resorption incident to orthodontic tooth movement in rats. **Journal of dental research**, v. 75, n. 9, p. 1644–9, 1996.

- 10 Yamasaki, K.; Miura, F.; et al. Prostaglandin as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rats. **Journal of dental research**, v. 59, n. 10, p. 1635–42, 1980.
- 11 Takano-Yamamoto, T.; Kawakami, M.; et al. Effect of age on the rate of tooth movement in combination with local use of 1,25(OH)₂D₃ and mechanical force in the rat. **Journal of dental research**, v. 71, n. 8, p. 1487–92, 1992.
- 12 Gurton, A.U.; Akin, E.; et al. Effects of PGI₂ and TxA₂ analogs and inhibitors in orthodontic tooth movement. **The Angle orthodontist**, v. 74, n. 4, p. 526–32, 2004.
- 13 Kobayashi, Y.; Takagi, H.; et al. Effects of local administration of osteocalcin on experimental tooth movement. **The Angle orthodontist**, v. 68, n. 3, p. 259–66, 1998.
- 14 Kanzaki, H.; Chiba, M.; et al. Cyclical tensile force on periodontal ligament cells inhibits osteoclastogenesis through OPG induction. **Journal of dental research**, v. 85, n. 5, p. 457–62, 2006.
- 15 Davidovitch, Z.; Finkelson, M.D.; et al. Electric currents, bone remodeling, and orthodontic tooth movement. I. The effect of electric currents on periodontal cyclic nucleotides. **American journal of orthodontics**, v. 77, n. 1, p. 14–32, 1980.
- 16 Davidovitch, Z.; Finkelson, M.D.; et al. Electric currents, bone remodeling, and orthodontic tooth movement. II. Increase in rate of tooth movement and periodontal cyclic nucleotide levels by combined force and electric current. **American journal of orthodontics**, v. 77, n. 1, p. 33–47, 1980.
- 17 Shirazi, M.; Dehpour, A.R.; et al. The effect of thyroid hormone on orthodontic tooth movement in rats. **The Journal of clinical pediatric dentistry**, v. 23, n. 3, p. 259–64, 1999.
- 18 Wilcko, M.T.; Wilcko, W.M.; et al. Accelerated osteogenic orthodontics technique: a 1-stage surgically facilitated rapid orthodontic technique with alveolar augmentation. **Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 67, n. 10, p. 2149–59, 2009.
- 19 Wilcko, W.M.; Wilcko, T.; et al. Rapid orthodontics with alveolar reshaping: two case reports of decrowding. **The International journal of periodontics & restorative dentistry**, v. 21, n. 1, p. 9–19, 2001.
- 20 Lim, H.M.; Lew, K.K.; et al. A clinical investigation of the efficacy of low level laser therapy in reducing orthodontic postadjustment pain. **American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American**

Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics, v. 108, n. 6, p. 614–22, 1995.

21 Rodrigues MT, Ribeiro MS, Groth EB, Z.D. Evaluation of effects of laser therapy ($\lambda=830$ nm) on oral ulceration induced by fixed orthodontic appliances. **Lasers. Lasers Surg Med.**, v. 30, n. Suppl 14, p. 15, 2002.

22 Yoshida, T.; Yamaguchi, M.; et al. Low-energy laser irradiation accelerates the velocity of tooth movement via stimulation of the alveolar bone remodeling. **Orthodontics & Craniofacial Research**, v. 12, n. 4, p. 289–298, 2009.

23 Kanzaki, H.; Chiba, M.; et al. Local OPG gene transfer to periodontal tissue inhibits orthodontic tooth movement. **Journal of dental research**, v. 83, n. 12, p. 920–5, 2004.

24 Kasai, S.; Kono, T.; et al. Effect of low-power laser irradiation on impulse conduction in anesthetized rabbits. **Journal of clinical laser medicine & surgery**, v. 14, n. 3, p. 107–9, 1996.

25 Kawasaki, K.; Shimizu, N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 26, n. 3, p. 282–291, 2000.

26 Aihara, N.; Yamaguchi, M.; et al. Low-energy irradiation stimulates formation of osteoclast-like cells via RANK expression in vitro. **Lasers in Medical Science**, v. 21, n. 1, p. 24–33, 2006.

27 Ozawa, Y.; Shimizu, N.; et al. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. **Bone**, v. 22, n. 4, p. 347–354, 1998.

28 Kim, J.G.; Kim, J.H.; et al. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. **Menopause (New York, N.Y.)**, v. 14, n. 5, p. 913–8,

29 Fujita, S.; Yamaguchi, M.; et al. Low-energy laser stimulates tooth movement velocity via expression of RANK and RANKL. **Orthodontics and Craniofacial Research**, v. 11, n. 3, p. 143–155, 2008.

30 Kim, T.; Handa, A.; et al. RANKL expression in rat periodontal ligament subjected to a continuous orthodontic force. **Archives of Oral Biology**, v. 52, n. 3, p. 244–250, 2007.

- 31 Yamaguchi, M.; Aihara, N.; et al. RANKL increase in compressed periodontal ligament cells from root resorption. **Journal of dental research**, v. 85, n. 8, p. 751–756, 2006.
- 32 Low, E.; Zoellner, H.; et al. of mRNA for osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa ?? ligand (RAExpressionNKL) during root resorption induced by the application of heavy orthodontic forces on rat molars. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 128, n. 4, p. 497–503, 2005.
- 33 Tyrovola, J.B.; Perrea, D.; et al. Relation of soluble RANKL and osteoprotegerin levels in blood and gingival crevicular fluid to the degree of root resorption after orthodontic tooth movement. **Journal of oral science**, v. 52, n. 2, p. 299–311, 2010.
- 34 Yamaguchi, M.; Hayashi, M.; et al. Low-energy laser irradiation facilitates the velocity of tooth movement and the expressions of matrix metalloproteinase-9, cathepsin K, and alpha(v) beta(3) integrin in rats. **European Journal of Orthodontics**, v. 32, n. 2, p. 131–139, 2010.
- 35 Jarry, C.R.; Duarte, P.M.; et al. Secreted osteoclastogenic factor of activated T cells (SOFAT), a novel osteoclast activator, in chronic periodontitis. **Human Immunology**, v. 74, n. 7, p. 861–866, 2013.
- 36 Yan, Y.; Liu, F.; et al. T Cells Are Required for Orthodontic Tooth Movement. **Journal of dental research**, 2015.
- 37 Aghaloo, T.; Cowan, C.M.; et al. The Effect of NELL1 and Bone Morphogenetic Protein-2 on Calvarial Bone Regeneration. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 68, n. 2, p. 300–308, 2010.
- 38 Alhashimi, N.; Frithiof, L.; et al. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. **American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics**, v. 119, n. 3, p. 307–312, 2001.
- 39 Başaran, G.; Özer, T.; et al. Interleukins 2, 6, and 8 levels in human gingival sulcus during orthodontic treatment. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 130, n. 1, p. 1–6, 2006.
- 40 Dunn, M.D.; Park, C.H.; et al. Local delivery of osteoprotegerin inhibits mechanically mediated bone modeling in orthodontic tooth movement. **Bone**, v. 41, n. 3, p. 446–455, 2007.
- 41 Xie, R.; Kuijpers-Jagtman, A.M.; et al. Osteoclast differentiation during

experimental tooth movement by a short-term force application: an immunohistochemical study in rats. **Acta odontologica Scandinavica**, v. 66, n. 5, p. 314–320, 2008.

42 Kitaura, H.; Fujimura, Y.; et al. An M-CSF receptor c-Fms antibody inhibits mechanical stress-induced root resorption during orthodontic tooth movement in mice. **Angle Orthodontist**, v. 79, n. 5, p. 835–841, 2009.

43 Gonzales, C.; Hotokezaka, H.; et al. An in vivo 3D micro-CT evaluation of tooth movement after the application of different force magnitudes in rat molar. **Angle Orthodontist**, v. 79, n. 4, p. 703–714, 2009.

44 Brooks, P.; Nilforoushan, D.; et al. Molecular Markers of Early Orthodontic Tooth Movement. **Journal**, p. 4–9, 2009.

45 Zhuang, L.; Bai, Y.; et al. Three-dimensional morphology of root and alveolar trabecular bone during tooth movement using micro-computed tomography. **Angle Orthodontist**, v. 81, n. 3, p. 420–425, 2011.

46 Kim, J.Y.; Kim, B.I.; et al. Localization of osteopontin and osterix in periodontal tissue during orthodontic tooth movement in rats. **Angle Orthodontist**, v. 82, n. 1, p. 107–114, 2012.

47 Andrade Jr, I.; Taddei, S.R. a; et al. Inflammation and tooth movement: the role of cytokines, chemokines, and growth factors. **Seminars in Orthodontics**, v. 18, n. 4, p. 257–269, 2012.

48 Ru, N.; Liu, S.S.-Y.; et al. In vivo microcomputed tomography evaluation of rat alveolar bone and root resorption during orthodontic tooth movement. **The Angle Orthodontist**, p. 121003111608003, 2012.

49 Megat Abdul Wahab, R.; Md Dasor, M.; et al. Crevicular alkaline phosphatase activity and rate of tooth movement of female orthodontic subjects under different continuous force applications. **International Journal of Dentistry**, v. 2013, p. 11–13, 2013.

50 Barbieri, G.; Solano, P.; et al. Biochemical markers of bone metabolism in gingival crevicular fluid during early orthodontic tooth movement. **The Angle Orthodontist**, v. 83, n. 1, p. 120620122630000, 2012.

51 Grant, M.; Wilson, J.; et al. Induction of cytokines, MMP9, TIMPs, RANKL and OPG during orthodontic tooth movement. **European Journal of Orthodontics**, v. 35, n. 5, p. 644–651, 2013.

52 Flórez-Moreno, G.A.; Isaza-Guzmán, D.M.; et al. Time-related changes in

salivary levels of the osteotropic factors sRANKL and OPG through orthodontic tooth movement. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 143, n. 1, p. 92–100, 2013.

53 Nakano, T.; Hotokezaka, H.; et al. Effects of different types of tooth movement and force magnitudes on the amount of tooth movement and root resorption in rats. **The Angle orthodontist**, v. 00, n. 0, p. 1–7, 2014.

54 Cruz, D.R.; Kohara, E.K.; et al. Effects of low-intensity laser therapy on the orthodontic movement velocity of human teeth: A preliminary study. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 35, n. 2, p. 117–120, 2004.

55 Goulart, C.S.; Nouer, P.R.A.; et al. Photoradiation and orthodontic movement: experimental study with canines. **Photomedicine and laser surgery**, v. 24, n. 2, p. 192–196, 2006.

56 Limpanichkul, W.; Godfrey, K.; et al. Effects of low-level laser therapy on the rate of orthodontic tooth movement. **Orthodontics & craniofacial research**, v. 9, n. 1, p. 38–43, 2006.

57 Yamaguchi, M.; Fujita, S.; et al. Low-energy laser irradiation stimulates the tooth movement velocity via expression of M-CSF and c-fms. v. 66, p. 139–148, 2007.

58 Seifi, M.; Shafeei, H.A.; et al. Effects of two types of low-level laser wave lengths (850 and 630 nm) on the orthodontic tooth movements in rabbits. **Lasers in Medical Science**, v. 22, n. 4, p. 261–264, 2007.

59 Youssef, M.; Ashkar, S.; et al. The effect of low-level laser therapy during orthodontic movement: A preliminary study. **Lasers in Medical Science**, v. 23, n. 1, p. 27–33, 2008.

60 Yoshida, T.; Yamaguchi, M.; et al. Low-energy laser irradiation accelerates the velocity of tooth movement via stimulation of the alveolar bone remodeling. **Orthodontics and Craniofacial Research**, v. 12, n. 4, p. 289–298, 2009.

61 Gama, S.K.C.; Habib, F. a L.; et al. Tooth movement after infrared laser phototherapy: clinical study in rodents. **Photomedicine and laser surgery**, v. 28 Suppl 2, p. S79–S83, 2010.

62 Kim, Y.D.; Kim, S.S.; et al. Low-level laser irradiation facilitates fibronectin and collagen type i turnover during tooth movement in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 25, n. 1, p. 25–31, 2010.

63 Mayahara, K.; Yamaguchi, A.; et al. Effect of Ga-Al-As laser irradiation on

COX-2 and cPLA2-alpha expression in compressed human periodontal ligament cells. **Lasers in surgery and medicine**, v. 42, n. 6, p. 489–493, 2010.

64 Habib, F. a L.; Gama, S.K.C.; et al. Laser-induced alveolar bone changes during orthodontic movement: a histological study on rodents. **Photomedicine and laser surgery**, v. 28, n. 6, p. 823–830, 2010.

65 Duan, J.; Na, Y.; et al. Effects of the Pulse Frequency of Low-Level Laser Therapy on the Tooth Movement Speed of Rat Molars. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, n. 11, p. 663–667, 2012.

66 Genc, G.; Kocadereli, I.; et al. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on orthodontic tooth movement. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 1, p. 41–47, 2013.

67 Habib, F. a. L.; Gama, S.K.C.; et al. Effect of Laser Phototherapy on the Hyalinization Following Orthodontic Tooth Movement in Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 30, n. 3, p. 179–185, 2012.

68 Altan, B.A.; Sokucu, O.; et al. Metrical and histological investigation of the effects of low-level laser therapy on orthodontic tooth movement. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 1, p. 131–140, 2012.

69 Long, H.; Pyakurel, U.; et al. Interventions for accelerating orthodontic tooth movement: A systematic review. **Angle Orthodontist**, v. 83, n. 1, p. 164–171, 2013.

70 Domínguez, A.; Gómez, C.; et al. Effects of low-level laser therapy on orthodontics: rate of tooth movement, pain, and release of RANKL and OPG in GCF. **Lasers in Medical Science**, p. 1–9, 2013.

71 Marquezan, M.; Bolognese, A.M.; et al. Evaluation of two protocols for low-level laser application in patients submitted to orthodontic treatment. **Dental press journal of orthodontics**, v. 18, n. 1, p. 33.e1–9, 2013.

72 Jawad, M.M.; Husein, A.; et al. Overview of non-invasive factors (low level laser and low intensity pulsed ultrasound) accelerating tooth movement during orthodontic treatment. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 1, p. 367–372, 2014.

73 Shirazi, M.; Ahmad Akhoundi, M.S.; et al. The effects of diode laser (660nm) on the rate of tooth movements: an animal study. **Lasers in Medical Science**, p. 1–6, 2013.

74 Lu, L.H.; Lee, K.; et al. Histological and histochemical quantification of root resorption incident to the application of intrusive force to rat molars. **European Journal of Orthodontics**, v. 21, n. 1, p. 57–63, 1999.

75 Seifi, M.; Jessri, M. Expression of RANKL mRNA during Root Resorption

- Induced by Orthodontic Tooth Movement in Rats. **Yakhteh**, n. 22, p. 293–298,
- 76 Zhao, N.; Liu, Y.; et al. Effects of local osteoprotegerin gene transfection on orthodontic root resorption during retention: An in vivo micro-CT analysis. **Orthodontics and Craniofacial Research**, v. 15, n. 1, p. 10–20, 2012.
- 77 Ekizer, A.; Uysal, T.; et al. Effect of LED-mediated-photobiomodulation therapy on orthodontic tooth movement and root resorption in rats. **Lasers in Medical Science**, p. 1–7, 2013.
- 78 D’Andrea Fonseca, P.; Lima, F.M. De; et al. Effects of light emitting diode (LED) therapy at 940 nm on inflammatory root resorption in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 1, p. 49–55, 2013.
- 79 Seifi M, Atri F, Y.M. Effects of low-level laser therapy on orthodontic tooth movement and root resorption after artificial socket preservation. **Dent Res J (Isfahan)**, v. 11, n. 1, p. 61–6, 2014.
- 80 Nimeri, G.; Kau, C.H.; et al. The effect of photobiomodulation on root resorption during orthodontic treatment. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, v. 6, p. 1–8, 2014.
- 81 Inubushi, T.; Tanaka, E.; et al. Ultrasound stimulation attenuates resorption of tooth root induced by experimental force application. **Bone**, v. 53, n. 2, p. 497–506, 2013.
- 82 Kwak, J.; Zara, J.N.; et al. NELL-1 injection maintains long-bone quantity and quality in an ovariectomy-induced osteoporotic senile rat model. **Tissue engineering. Part A**, v. 19, n. 3-4, p. 426–36, 2013.
- 83 Al-Daghreer, S.; Doschak, M.; et al. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on orthodontically induced root resorption in beagle dogs. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 40, n. 6, p. 1187–1196, 2014.
- 84 Murphy, C.; Kalajzic, Z.; et al. The effect of corticision on root resorption with heavy and light forces. **The Angle Orthodontist**, v. 00, n. 0, p. 150401112935002, 2015.
- 85 Han, G.; Huang, S.; et al. Root resorption after orthodontic intrusion and extrusion: An intraindividual study. **Angle Orthodontist**, v. 75, n. 6, p. 912–918, 2005.
- 86 Burstone CJ No The biomechanics of tooth movement. In: RR Kraus BS (Ed.); **Vistas in orthodontics**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1962, p. 10.
- 87 Kim, S.J.; Kang, Y.G.; et al. Effects of low-intensity laser therapy on periodontal

tissue remodeling during relapse and retention of orthodontically moved teeth. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 1, p. 325–333, 2013.

88 Kohno, T.; Matsumoto, Y.; et al. Experimental tooth movement under light orthodontic forces: rates of tooth movement and changes of the periodontium.

Journal of orthodontics, v. 29, n. 2, p. 129–35, 2002.

89 Gonzales, C.; Hotokezaka, H.; et al. Force magnitude and duration effects on amount of tooth movement and root resorption in the rat molar. **Angle Orthodontist**, v. 78, n. 3, p. 502–509, 2008.

90 Torri, S.; Weber, J.B.B. Influence of low-level laser therapy on the rate of orthodontic movement: a literature review. **Photomedicine and laser surgery**, v. 31, n. 9, p. 411–21, 2013.

91 Ge, M.K.; He, W.L.; et al. Efficacy of low-level laser therapy for accelerating tooth movement during orthodontic treatment: a systematic review and meta-analysis. **Lasers in Medical Science**, p. 1–10, 2014.

92 Taddei, S.R.D.A.; Moura, A.P.; et al. Experimental model of tooth movement in mice: A standardized protocol for studying bone remodeling under compression and tensile strains. **Journal of Biomechanics**, v. 45, n. 16, p. 2729–2735, 2012.

93 Bo, M. Von; Maltha, J.C.; et al. Focal hyalinization during experimental tooth movement in beagle dogs. p. 615–623,

94 Carvalho-Lobato, P.; Garcia, V.J.; et al. Tooth movement in orthodontic treatment with low-level laser therapy: a systematic review of human and animal studies. **Photomedicine and laser surgery**, v. 32, n. 5, p. 302–9, 2014.

95 Rodrigo SM, Cunha A, Pozza DH, Blaya DS, Moraes JF, W.J. et al Analysis of the systemic effect of red and infrared laser therapy on wound repair. **Photomed Laser Surg**, v. 27, p. 929–935, 2009.

96 Izquierdo, A.D.M.; Mishima, F.D.; et al. Effects of induced precocious puberty on cranial growth in female Wistar rats. **European Journal of Orthodontics**, v. 34, n. 2, p. 133–140, 2012.

97 Tyrovola, J.B. The “Mechanostat Theory” of Frost and the OPG/RANKL/RANK System. **Journal of Cellular Biochemistry**, n. June, p. n/a–n/a, 2015.

98 Xu, M.; Deng, T.; et al. Low-intensity pulsed laser irradiation affects RANKL and OPG mRNA expression in rat calvarial cells. **Photomedicine and laser surgery**, v. 27, n. 2, p. 309–15, 2009.

99 Saito, C.T.M.H.; Gulinelli, J.L.; et al. Effect of low-level laser therapy on the

healing process after tooth replantation: a histomorphometrical and immunohistochemical analysis. **Dental traumatology: official publication of International Association for Dental Traumatology**, v. 27, n. 1, p. 30–9, 2011.

100 Altan, A.B.; Bicakci, A.A.; et al. The effects of low-level laser therapy on orthodontically induced root resorption. p. 2067–2076, 2015.

101 Pompermaier, T.; Coelho, U.; et al. Cytokine Differential expression of osteoblast and osteoclast chemmoattractants in compression and tension sides during orthodontic movement. v. 42, p. 330–335, 2008.

102 Marquezan, M.; Bolognese, A.M.; et al. Effects of two low-intensity laser therapy protocols on experimental tooth movement. **Photomedicine and laser surgery**, v. 28, n. 6, p. 757–762, 2010.

103 Huang, T.H.; Lu, Y.C.; et al. Low-level diode laser therapy reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced bone cell inflammation. **Lasers in Medical Science**, v. 27, n. 3, p. 621–627, 2012.

104 Santos, S.A. Dos; Alves, A.C.A.; et al. Comparative analysis of two low-level laser doses on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 3, p. 1051–1058, 2014.

105 Bouxsein, M.L.; Boyd, S.K.; et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468–1486, 2010.

106 Vieira, G.M.; Chaves, S.B.; et al. The effect of simvastatin on relapse of tooth movement and bone mineral density in rats measured by a new method using microtomography. **Acta cirúrgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia**, v. 30, n. 5, p. 319–27, 2015.

107 Yadav, S.; Dobie, T.; et al. Effect of low-frequency mechanical vibration on orthodontic tooth movement. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 148, n. 3, p. 440–449, 2015.

108 Ru, N.; Liu, S.S.-Y.; et al. In vivo microcomputed tomography evaluation of rat alveolar bone and root resorption during orthodontic tooth movement. **The Angle Orthodontist**, v. 00, n. 0, p. 121003111608003, 2012.

109 Kim, K.-A.; Choi, E.-K.; et al. Effect of low-level laser therapy on orthodontic tooth movement into bone-grafted alveolar defects. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 148, n. 4, p.

608–617, 2015.

110 Hayashi, H.; Terao, A.; et al. Effects of a low level laser on periodontal tissue in hypofunctional teeth. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e100066, 2014.

111 Romão, M.M.A.; Marques, M.M.; et al. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of human alveolar bone repair induced by laser phototherapy: a pilot study. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, 2015.

112 Brezniak, N.; Wasserstein, A. Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part II: The clinical aspects. **The Angle orthodontist**, v. 72, n. 2, p. 180–4, 2002.

113 Han, K.H.; Park, J.H.; et al. Effect of frequent application of low-level laser therapy on corticotomized tooth movement in dogs: A pilot study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 6, p. 1182.e1–1182.e12, 2014.

114 Nakano, Y.; Yamaguchi, M.; et al. Expressions of RANKL/RANK and M-CSF/c-fms in root resorption lacunae in rat molar by heavy orthodontic force. **European Journal of Orthodontics**, v. 33, n. 4, p. 335–343, 2011.

115 Zhou, J.; Feng, G.; et al. Die Expression von Osteoprotegerin und des Rezeptor-Aktivators des Nuklearfaktor- κ B-Liganden bei der durch starke Krafteinwirkung induzierten Wurzelresorption bei Ratten. **Journal of Orofacial Orthopedics**, v. 72, n. 6, p. 457–468, 2011.

116 Brudvik, P.; Rygh, P. Root resorption beneath the main hyalinized zone. **European journal of orthodontics**, v. 16, n. 4, p. 249–63, 1994.

117 Hellsing, E.; Hammarstrom, L. The hyaline zone and associated root surface changes in experimental orthodontics in rats: a light and scanning electron microscope study. **European journal of orthodontics**, v. 18, n. 1, p. 11–8, 1996.

118 Gonzales, C.; Hotokezaka, H.; et al. Repair of root resorption 2 to 16 weeks after the application of continuous forces on maxillary first molars in rats: A 2- and 3-dimensional quantitative evaluation. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 137, n. 4, p. 477–485, 2010.

119 Hashmi, J.T.; Huang, Y.-Y.; et al. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. **PM & R : the journal of injury, function, and rehabilitation**, v. 2, n. 12 Suppl 2, p. S292–305, 2010.

120 Pansani, T.N.; Basso, F.G.; et al. Effects of low-level laser therapy on the proliferation and apoptosis of gingival fibroblasts treated with zoledronic acid.

International journal of oral and maxillofacial surgery, v. 43, n. 8, p. 1030–4, 2014.

121 Chung, H.; Dai, T.; et al. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. **Ann. Biomed Eng.**, v. 40, n. 2, p. 516–533, 2012.

122 Hayashi, K.; Igarashi, K.; et al. Involvement of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 122, n. 3, p. 306–309, 2002.

123 Gurton, A.U.; Akin, E.; et al. Effects of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. **American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics**, v. 126, n. 5, p. 608–14, 2004.

124 Yoo, S.K.; Warita, H.; et al. Duration of orthodontic force affecting initial response of nitric oxide synthase in rat periodontal ligaments. **Journal of Medical and Dental Sciences**, v. 51, n. 1, p. 83–88, 2004.

125 Shirazi, M.; Nilforoushan, D.; et al. The role of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. **The Angle orthodontist**, v. 72, n. 3, p. 211–215, 2002.

126 Chen, A.C.-H.; Arany, P.R.; et al. Low-Level Laser Therapy Activates NF- κ B via Generation of Reactive Oxygen Species in Mouse Embryonic Fibroblasts. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e22453, 2011.

127 Yu, M.; Qi, X.; et al. NF- κ B signaling participates in both RANKL- and IL-4-induced macrophage fusion: receptor cross-talk leads to alterations in NF- κ B pathways. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 187, n. 4, p. 1797–806, 2011.

128 Farivar, S.; Malekshahabi, T.; et al. Biological effects of low level laser therapy. **Journal of lasers in medical sciences**, v. 5, n. 2, p. 58–62, 2014.

ANEXO 1: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS **Parecer - Projeto Nº 100/12 - CEUA-IPEN/SP**

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa “ESTUDO IN VIVO DOS EFEITOS DA TERAPIA LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA” de responsabilidade da pesquisadora **MARTHA SIMÕES RIBEIRO** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEUA.

São Paulo, 29 de março de 2012

Prof. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEUA-IPEN

ANEXO 2: SUBMISSÃO DO ARTIGO NO JOURNAL OF BIOPHOTONICS

Journal of
BIOPHOTONICS

[HOME](#) • [LOGOUT](#) • [HELP](#) • [REGISTER](#) • [UPDATE MY INFORMATION](#) • [JOURNAL OVERVIEW](#)
[MAIN MENU](#) • [CONTACT US](#) • [SUBMIT A MANUSCRIPT](#) • [INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#)

Editorial Manager®
Role: [Author](#) Username: [sellyszk](#)

Revisions Being Processed for Author Selly Suzuki

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed)
Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Date Submission Began	Current Status
View Submission Author Response Send E-mail	jbio.201600016R1	Effect of low-level laser therapy on bone metabolism and root resorption process using an orthodontic tooth movement model in rats	22 Apr 2016	Under review

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed)
Display 10 results per page.

Journal of Biophotonics

Effect of low-level laser therapy on bone metabolism and root resorption process using an orthodontic tooth movement model in rats

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	jbio.201600016R1
Full Title:	Effect of low-level laser therapy on bone metabolism and root resorption process using an orthodontic tooth movement model in rats
Article Type:	Full Article
Section/Category:	Photodynamic Therapy / Low-Level Laser Therapy
Keywords:	bone remodeling; microCT; near infrared laser; RANKL; root resorption
Corresponding Author:	Selly Suzuki Center for Lasers and Applications - Nuclear and Energy Research Institute Sao Paulo, SP BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Center for Lasers and Applications - Nuclear and Energy Research Institute
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Selly Suzuki
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Selly Suzuki Aguinaldo Silva Garcez Hideo Suzuki Edilson Ervolino Won Moon Martha Simões Ribeiro
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	This study evaluated the biological effects of low-level laser therapy (LLLT) on bone remodeling, tooth displacement and root resorption during orthodontic tooth movement. Upper first molars of a total of sixty eight male rats were subjected to orthodontic tooth movement and euthanized on days 3, 6, 9, 14 and 21 days and divided as negative control, control and LLLT group. Tooth displacement and histomorphometric analysis were performed in all animals; scanning electron microscopy analysis was done on days 3, 6 and 9, as well as the immunohistochemistry analysis of RANKL/OPG and TRAP markers. Volumetric changes in alveolar bone were analyzed using MicroCT images on days 14 and 21. LLLT influenced bone resorption by increasing the number of TRAP-positive osteoclasts and the RANKL expression at the compression side. This resulted in less alveolar bone and hyalinization areas on days 6, 9 and 14. LLLT also induced less bone volume and density, facilitating significant acceleration of tooth movement and potential reduction in root resorption besides stimulating bone formation at the tension side by enhancing OPG expression, increasing trabecular thickness and bone volume on day 21. Taken together, our results indicate that LLLT can stimulate bone remodeling reducing root resorption in a rat model.
Additional Information:	
Question	Response
Please submit a plain text version of your cover letter here.	We are sending to you the original manuscript in order to submit it for publication in Journal of Biophotonics. This innovative study sought to present the effect of low-level