UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Avaliação da remodelação óssea após disjunção da sutura
palatina mediana experimental e laserterapia de baixa potência, em
ratos Wistar

Adriana Sasso Stuani

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Tit. Dr. Mário Hiroyuki Hirata

São Paulo
2012

Adriana Sasso Stuani

Avaliação da remodelação óssea após disjunção da sutura
palatina mediana experimental e laserterapia de baixa potência, em
ratos Wistar

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Tit Dr. Mário Hiroyuki Hirata
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

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

Stuani, Adriana Sasso

Avaliação da remodelação óssea após disjunção da sutura palatina mediana experimental e laserterapia de baixa potência, em ratos Wistar. São Paulo, 2012.

153f. ;30 il; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP. Área de concentração: Análises Clínicas.

Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki.

1. disjunção maxilar - 2. laserterapia - 3. remodelação óssea - 4. angiogenese - 5. proteínas ósseas. I. Stuani, AS. II. Avaliação da remodelação óssea após disjunção da sutura palatina mediana experimental e laserterapia de baixa potência, em ratos wistar

Dedico Este Trabalho

A Deus, Onipresente e Onipotente, pelo dom da vida, por ter me dado uma mãe maravilhosa, um exemplo de vida... Minha eterna gratidão!

Margarida Maria Sasso Stuani (in memoriam)

Minhas Irmãs *Eliana, Maria Lúcia, Bernadete, Cristina e Andréa*

Obrigada pelo apoio para superar adversidades, pela amizade,
companheirismo, compreensão e acima de tudo carinho a
mim dispensado.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Diretor Prof. Tit. Jorge Mancini Filho.

À Profa. Bernadette Dora Gombossy de Mello Franco, presidente da Comissão de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

À Profa. Primavera Borelli Garcia, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas dessa mesma instituição, em nome do seu chefe Prof^a Marina Baquerizo Martinez.

Ao meu orientador Prof. Tit. Dr. Mário Hiroyuki Hirata, pela oportunidade a mim dada, por suas contribuições fundamentais para a realização deste trabalho, pela disponibilidade, paciência, confiança e liberdade no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!!

À Profa. Maria Rosario Dominguez Crespo Hirata, pelo exemplo de determinação e dedicação ao ensino.

Aos Professores Dr. Adalberto Rosa e Dra. Maria Bernadete Sasso Stuari pela ajuda na parte laboratorial deste trabalho.

À Profa. Dra. Mamie Iyomasa Mizusaki pela amizade e ajuda nas realizações de vários trabalhos durante todos estes anos.

Ao Prof Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva pela amizade, pela disponibilidade e ajuda indispensável durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às Técnicas de Laboratório Cristina Moreno Fajardo (LBMAD Laboratorio de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnostico da FCF-USP) e Fabiola de Oliveira (Laboratório de Biologia Molecular da FORP-USP) pelo auxilio na execução da parte laboratorial deste projeto.

A todos os meus colegas do LBMAD/FCF e da FORP/USP pelos bons momentos que compartilhamos ao longo deste trabalho. Obrigada a todos!

Aos Professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela convivência durante todos esses anos, pelo carinho e atenção que sempre manifestaram.

Aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas desta instituição, em especial a secretarias Ana Maria Dias Dantas, Edna Batista Lima, Maria Auxiliadora Lima e Sueli Providela. Muito obrigada!

Aos funcionários do Biotério de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - FORP/USP.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida entre 2008 a 2012.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte técnico, científico e financeiro, fundamentais para a realização desta pesquisa.

A todos aqueles que não foram citados, mas partilharam deste momento em minha vida.

RESUMO

STUANI, AS. **Avaliação da remodelação óssea após disjunção da sutura palatina mediana experimental e a laserterapia de baixa potência, em ratos wistar.** 2012. 153f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo 2012.

INTRODUÇÃO: O uso da laserterapia concernente ao estímulo da formação óssea e da revascularização tem tornado objeto de estudo na área de saúde. **OBJETIVO:** O presente trabalho *in vivo* teve como objetivo avaliar quantitativamente os efeitos do laser de baixa potência (LBP) na remodelação óssea após a expansão rápida da maxila (ERM) em ratos jovens, através da expressão do RNAm dos genes *RANK*, *RANK-L*, Osteoprotegerina (*OPG*), e o Fator do Crescimento do Endotélio Vascular (*VEGF*) bem como a análise histológica. **MATERIAL E MÉTODO:** Utilizou-se 105 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, albinus), machos, divididos em 4 grupos: **Grupo Controle** (n=10) animais não tratados (sem ERM e sem aplicação do LBP); **Grupo Experimental I** (n=40) animais que tiveram apenas a ERM; sendo 25 animais sacrificados nos dias 1, 2, 3, 7, e 10 dias após a ERM para análise com RT-PCR e western blotting e 15 animais foram sacrificados nos dias 0, 7 e 10 dias para análise histológica; **Grupo Experimental II** (n=40) animais que tiveram ERM + LBP com diodo de Ga-Al-As (Gálio-Alumínio-Arsênio:160J/cm²) no primeiro dia do experimento; os animais foram sacrificados nos mesmos períodos que o Grupo Experimental I; **Experimental III** (n=15) animais que receberam 3 aplicações de LBP após ERM, totalizando 480J/cm². Os animais foram sacrificados nos dias 3, 7 e 10 dias após a ERM para análise com RT-PCR e western blotting. A extração do RNAt da maxila foi feita com trizol. A síntese da fita de DNA complementar (cDNA) foi feita a partir de 1µg de RNA, por meio de uma reação de transcrição reversa, com a utilização da enzima transcriptase reversa, e a análise da expressão gênica foi realizada pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qRT-PCR) no sistema TaqMan®. A análise protéica do *VEGF*, *RANK*, *RANK-L* e *OPG* foi realizada por meio da técnica western blotting. O teste de variância (ANOVA) foi usado comparando os grupos entre si e inter-grupos seguida pelo teste complementar de Tukey, com nível de significância de 5%. **RESULTADOS:** A separação dos incisivos induzida pela ERM foi semelhante nos grupos experimentais I e II, o espaço entre os incisivos foi mantido durante toda a fase experimental, e não houve diferença significativa entre os grupos laser e não-laser (p<0,05), demonstrando a eficiência da metodologia usada para abertura da sutura palatina mediana. Para o grau de abertura da sutura, foi quantificada, a área de abertura sutural em todos os grupos após a ERM, e observou-se aumentou significativo comparado com o grupo controle, sendo que no grupo de laser o grau de abertura final foi significativamente menor no grupo laser do que não-laser aos 7 e 14 dias, mostrando que a formação óssea no grupo laser foi mais acelerada, o que pode ser comprovado com os dados histológicos, demonstrando que o laser acelerou o processo de formação óssea. Em relação à expressão relativa dos genes *RANK/RANK-L/OPG* tanto o grupo com laser quanto o sem-laser mostraram um aumento significativo da expressão comparado ao grupo controle (p < 0,05), principalmente nos períodos iniciais e quando comparou-se o grupo irradiado com o não irradiado observou-se que no grupo com laser houve uma maior expressão desses genes do que no grupo sem laser. **CONCLUSÃO:** Os resultados sugerem que a formação óssea após a ERM foi observada dentro da sutura palatina e o uso do LBP influenciou a formação óssea acelerando o processo de osteogênese durante a fase inicial do experimento.

Palavras-chave: disjunção maxilar, laserterapia, remodelação óssea, angiogenese, proteínas ósseas.

ABSTRACT

STUANI, AS. **Bone remodeling after experimental rapid maxillary expansion and low-level laser therapy, in Wistar rats.** 2012. 153p. Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BACKGROUND: The use of low-level laser therapy with bone stimulation has been studied in the health science field. **OBJECTIVE:** The aim of the present *in vivo* study was to quantitatively evaluate the effects of low-level laser therapy (LLLT) on bone healing after rapid maxillary expansion (RME) in young rats, and the *RANK*, *RANK-L*, *OPG* and *VEGF* gene expressions; and histological analyses. **MATERIALS and METHODS:** A total of 105 rats Wistar (*Rattus norvegicus*, albinus), male were assigned to four groups: Control Group (n=10) with no treatment (no RME and no LLLT); Experimental I (n=40) with RME without LLLT: 25 animals were euthanized at days 1, 2, 3, 7 and 10 after RME for real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blotting analysis and 15 animals were euthanized at days 0, 7 and 10 after RME for histological evaluation; Experimental II (n=40) with RME and LLLT (160J/cm²): animals were euthanized at the same periods described for Experimental I. Experimental III (n=15) with RME and 3 application of LLLT (480J/cm²): animals were euthanized at days 3, 7 and 10 after RME for real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blotting analysis. Part of the sample was kept at -80°C for genes expression and protein production, and another for histological analysis. The total RNA was extracted using trizol. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using 1 µg of RNA in a reverse transcription reaction and for genes expression we used RT-PCR in the TaqMan® system. The *RANK*, *RANK-L*, *OPG*, and *VEGF* and proteins analysis was made using western blotting. The ANOVA and Tukey tests were used and significance level was set at 5%. **RESULTS:** The expansion-induced opening of the incisors was similar among the groups, the space between the incisors was kept during all the experimental phase and there was no difference between laser and no laser therapy groups (p<0,05) showing that this methodology was efficient to open the palatine suture. The the opened along the suture was quantified, the area in all RME groups significantly increased compared with control group. Following laser therapy, the palatal suture opening decreased at 7 and 14 days, showing that bone formation in laser group was accelerate, and it was proved with histological analysis, that showed that LLLT accelerated bone formation. Regarding *RANK/RANK-L/OPG* gene expression, both laser and no-laser therapy groups showed a significant increased in these genes expression, compared to the control group, mainly at the initial periods of healing. Laser therapy group showed a higher expression of these genes than no laser group. **CONCLUSIONS:** The results suggest that bone formation after RME was observed within palatal suture and the application of the LLLT influenced bone formation accelerating the process of bone mineralization during the initial experimental phase.

Keywords: rapid maxillary expansion, laser therapy, bone remodeling, angiogenesis, bone protein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Representação esquemática das principais vias de sinalização na regulação da remodelação óssea efetuada pelos pré-osteoblastos.....24
- Figura 2 - Vista oclusal durante irradiação de laser na sutura palatina mediana, com o dispositivo ortodôntico entre os incisivos centrais.....62
- Figura 3 - Fotos histológicas mostrando a medida da distância entre os incisivos (seta) no Grupo Controle (A) e imediatamente pós expansão (B).65
- Figura 4 - Fotos histológicas mostrando as medidas da distância entre as bordas da sutura palatina mediana no terço cervical (a), médio (b) e nasal (c) e imediatamente pós expansão (dia 0).66
- Figura 5 - Medida da distância do espaço entre os incisivos no terço médio da coroa destes dentes nos Grupos Controle, Experimental I e II. Os dados correspondem a 0, 7 e 14 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$80
- Figura 6 - Medida do espaço no terço médio da coroa dos incisivos dos Grupos Experimentais I e II. Os dados correspondem a 0, 7 e 14 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns = não significativo.....80
- Figura 7 - Medida da largura da sutura no terço nasal dos grupos Exp I e II. Os dados correspondem a 0, 7 e 14 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$; ns = não significativo.....81
- Figura 8 - Medida da largura da sutura no terço nasal dos grupos Exp I e II. Os dados correspondem a 0, 7 e 14 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$; ns = não significativo.....81
- Figura 9 - Medida da largura da sutura no terço médio dos grupos Exp I e II. Os dados correspondem a 0, 7 e 14 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$; ns = não significativo.....83
- Figura 10 - Medida da largura da sutura no terço médio dos grupos Exp I e II. Os dados correspondem a 0, 7 e 14 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$; ns = não significativo.83
- Figura 11 - Medida da largura da sutura no terço cervical dos grupos Exp I e II. Os dados correspondem a 0, 7 e 14 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$; ns = não significativo.84
- Figura 12 - Medida da largura da sutura no terço cervical dos grupos Exp I e II. Os dados correspondem a 0, 7 e 14 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$; ns = não significativo.84
- Figura 13 - Região da sutura palatina mediana do grupo controle (corte frontal). A) visão panorâmica mostrando a sutura palatina mediana da porção cervical (seta vazada) até a região nasal (seta cheia). O tecido conjuntivo sutural (TC) está envolto por tecido ósseo (O) e delimitado pelas fossas nasais (FN) e pelas coroas dos incisivos superiores (IS). B) Detalhe da sutura onde é possível verificar osteoblastos (OB) delimitando a superfície óssea (setas brancas) e vasos sanguíneos (V) por toda extensão do tecido sutural. C) Presença de fibras colágenas (FC) inseridas no tecido ósseo e vários vasos sanguíneos (V).86
- Figura 14 - Região da sutura palatina mediana do grupo Experimental I tempo 0, (corte frontal). A) visão panorâmica mostrando a sutura palatina mediana onde observa intensa hemorragia (*). Em B) observa-se as fibras colágenas (FC) aderidas a parede óssea. C) Presença de fibras colágenas (FC) inseridas no tecido ósseo e alguns vasos sanguíneos (V).88
- Figura 15 - Região da sutura palatina mediana do grupo Experimental I (7º dia). A) visão panorâmica mostrando a sutura palatina mediana onde ainda observa área hemorrágica (*). Em B)

observa-se as cavidade medular revestida por osteoclastos (OC) em lacunas de Howship.	
C) Presença de osteoclastos (OC) na superfície interna da sutura palatina.	90
Figura 16 - Região da sutura palatina mediana do grupo Experimental I (10 ^o dia). A) visão panorâmica mostrando a sutura palatina mediana sem área hemorrágica. Em B) observa-se intensa proliferação de fibras colágenas.C) Presença de osteoblastos (OB) revestindo o tecido ósseo (setas pequenas) recém formado com a linha de repouso evidente (setas grandes) separando o osso antigo do novo.	92
Figura 17 - Região da sutura palatina mediana do grupo Experimental II (dia 0). A) visão panorâmica mostrando a sutura palatina mediana com áreas hemorrágicas (*) em toda extensão da sutura. B) observam-se fibras colágenas (FC) aderidas na superfície óssea e vasos sanguíneos congestos com hemácias (seta).	94
Figura 18 - Região da sutura palatina mediana do grupo Exp II (7 ^o dia). A) visão panorâmica mostrando a sutura palatina mediana com intensa proliferação de fibras colágenas. B) observam-se fibras colágenas (FC) distribuídas em diversas direções e osteoblastos (setas vazadas) recobrimdo a superfície óssea. C) osteoblastos (OB) ativos na superfície óssea e a linha de repouso entre o tecido ósseo antigo e o tecido ósseo novo (setas). ...	96
Figura 19 - Região da sutura palatina mediana do grupo Experimental II (10 ^o dia). A) visão panorâmica mostrando a sutura palatina mediana com intensa proliferação de fibras colágenas. B) observam-se fibras colágenas (FC) distribuídas em diversas direções e osteoblastos (setas pretas) recobrimdo a superfície óssea. C) osteoblastos ativos na superfície óssea (cabeça de seta) e osteócitos no interior do tecido ósseo recém-formado (setas brancas).	98
Figura 20 - Região da sutura palatina mediana do grupo Controle (A), Experimental I (B) e Experimental II (C). B) onde se observa o processo de reparo da sutura durante o período experimental.	99
Figura 21 - Expressão de RNAm <i>RANK</i> no Grupo Experimental I, II e III, comparado com o controle. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. **p<0,01; ***p<0,001; ns = não significante.	100
Figura 22 - Expressão de RNAm <i>RANK</i> no Grupo Experimental I e II. Os dados correspondem a 10 dias de experimento.Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.	101
Figura 23 - Expressão de RNAm <i>RANK</i> no Grupo Experimental II e III. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. As reações foram realizadas em quadruplicada e os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ***p<0,001.	101
Figura 24 - Expressão de RNAm <i>RANK</i> no Grupo Experimental I e III. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ***p<0,001.	101
Figura 25 - Expressão de RNAm <i>RANK-L</i> no Grupo Experimental I, II e III. Os dados correspondem a 10 dias de experimento, comparado com o controle. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. **p<0,01; ***p<0,001; ns = não significativo.	102
Figura 26 - Expressão de RNAm <i>RANK-L</i> no Grupo Experimental I e II. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns = não significante.	103
Figura 27 - Expressão de RNAm <i>RANK-L</i> no Grupo Experimental II e III. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *p<0,05; ***p<0,001.	103
Figura 28 - Expressão de RNAm <i>RANK-L</i> no Grupo Experimental I e III. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *p<0,05; ***p<0,001.	103
Figura 29 - Expressão de RNAm <i>OPG</i> no Grupo Experimental I, II e III. Os dados correspondem a 10 dias de experimento, comparado com o controle. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns=não significativo.	104

Figura 30 - Expressão de RNAm <i>OPG</i> no Grupo Experimental I e II. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; ns = não significativo.	105
Figura 31 - Expressão de RNAm <i>OPG</i> no Grupo Experimental II e III. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p<0,001$; ns = não significativo.	105
Figura 32 - Expressão de RNAm <i>OPG</i> no Grupo Experimental I e III. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p<0,001$; ns = não significativo.	105
Figura 33 - Expressão de RNAm <i>VEGF</i> no Grupo Experimental I e II. Os dados correspondem a 7 dias de experimento, comparado com o controle. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. * $p<0,05$; *** $p<0,001$	106
Figura 34 - Expressão de RNAm <i>VEGF</i> no Grupo Experimental I e II. Os dados correspondem a 7 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; ns = não significativo.	107
Figura 35 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>RANK</i> do grupo experimental I, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; * $p<0,05$; *** $p<0,001$	109
Figura 36 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>RANK</i> do grupo experimental II, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; *** $p<0,001$	109
Figura 37 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>RANK</i> do grupo experimental III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; ** $p<0,01$	109
Figura 38 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas obtidos por Western Blotting para a proteína <i>RANK</i> do grupo experimental I e II, durante a osteogênese após a expansão rápida da maxila, nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p<0,001$	111
Figura 39 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas obtidos por Western Blotting para a proteína <i>RANK</i> do grupo experimental II e III, durante a osteogênese após a expansão rápida da maxila, nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p<0,001$	111
Figura 40 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas obtidos por Western Blotting para a proteína <i>RANK</i> do grupo experimental I e III, durante a osteogênese após a expansão rápida da maxila, nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p<0,001$	111
Figura 41 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>RANK-L</i> do grupo experimental I, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; *** $p<0,001$	114
Figura 42 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>RANK-L</i> do grupo experimental II, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$	114
Figura 43 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>RANK-L</i> do grupo experimental III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; * $p<0,05$	114
Figura 44 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>RANK-L</i> do grupo experimental I e II, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos	

analizados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; * $p<0,05$; *** $p<0,001$.	115
Figura 45 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>RANK-L</i> do grupo experimental II e III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p<0,001$.	115
Figura 46 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>RANK-L</i> do grupo experimental I e III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p<0,001$.	115
Figura 47 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>OPG</i> do grupo experimental I, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; * $p<0,05$.	117
Figura 48 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>OPG</i> do grupo experimental II, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; *** $p<0,001$.	117
Figura 49 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>OPG</i> do grupo experimental III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; * $p<0,05$; ** $p<0,01$.	117
Figura 50 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>OPG</i> do grupo experimental I e II, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.	119
Figura 51 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>OPG</i> do grupo experimental II e III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.	119
Figura 52 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>OPG</i> do grupo experimental I e III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.	119
Figura 53 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>VEGF</i> do grupo experimental I, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; * $p<0,05$; ** $p<0,01$.	121
Figura 54 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>VEGF</i> do grupo experimental II, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; * $p<0,05$.	121
Figura 55 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>VEGF</i> do grupo experimental III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; * $p<0,05$.	121
Figura 56 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>VEGF</i> do grupo experimental I e II, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p<0,001$.	123
Figura 57 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>VEGF</i> do grupo experimental II e III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p<0,001$.	123
Figura 58 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína <i>VEGF</i> do grupo experimental I e III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p<0,001$.	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al-Ga-As	Alumínio-gálio-arsenieto
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comissão de ética no uso de animal
CSF	Fator estimulante de colônia
CSF-1	Fator estimulante da colônia de monócitos
CT	Threshold cycle
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etilenodiaminotetracetatodissódico
ERM	Expansão rápida da maxila
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G-CSF	Fator estimulante da colônia de granulócitos
H/E	Coloração hematoxilina e eosina
IGF	Fator de crescimento semelhante insulina
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
Laser	Light amplification by stimulated emission of radiation (Amplificação da luz por emissão estimulada da radiação)
LBP	Laser de baixa potência
LLLT	Low-level laser therapy
LP	Ligamento periodontal
M-CSF	Fator estimulante da colônia de macrófagos
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
OCC	Osteocalcina
OCIF	Fator inibitório da osteoclastogênese
OCN	Osteonectina
ODF	Fator de diferenciação dos osteoclastos
OPG	Osteoprotegerina
OPG-L	Ligante de Osteoprotegerina
PBS	Solução tampão de fosfato de sódio
pH	Potencial hidrogênioônico
PHT	Paratormônio
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PGE ₂	Prostaglandina

RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa β
RANK-L	Ligante do receptor ativador kappa β
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _t	Ácido ribonucleico total
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da pcr
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TGF- α	Fator de crescimento transformador alfa
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAP	Fosfatase ácida tártaro-resistente
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Expressa um valor em percentual
°C	Graus centígrados (Celsius)
g	Gramas
J	Joules
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
Ng	Nanograma
mL	Mililitro
mg	Micrograma
mg/ml	Miligramas por mililitro
mW	miliwatts
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
M	Molar
cm ²	Centímetro quadrado
µm	Micrometro
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µg/µl	Nanograma por nanolitro
+/-	Média
ΔCt	Delta Ct
ΔΔCt	Delta Delta Ct
dp	Desvio padrão
Hz	Hertz
p	Valor de p

SUMÁRIO

1. Introdução	19
2. Revista da Literatura	29
2.1 Biologia do Tecido Ósseo	31
2.2 Remodelação óssea sincronizada	38
2.2.1 Sistema <i>OPG/RANK/RANK-L</i> na ativação dos osteoclastos e remodelação óssea	38
2.2.1.1 <i>RANK-L</i>	41
2.2.1.2 <i>OPG</i>	42
2.2.1.3 <i>RANK</i>	44
2.2.2 Aspectos gerais da angiogênese	45
2.2.3 <i>VEGF</i> e remodelação óssea	48
3. Proposição	51
3.1 Objetivo geral	53
3.2 Objetivos específicos	53
4. Material e Método	55
4.1 Material	57
4.1.1 Amostragem (Seleção dos Animais)	57
4.1.2 Delineamento Experimental	57
4.2 Método	59
4.2.1 Anestesia dos Animais	59
4.2.2 Instalação e Ativação do Dispositivo Ortodôntico para a Disjunção da Sutura Palatina Mediana	59
4.2.3 Procedimento de Irradiação com Laser	61
4.2.4 Eutanásia dos Animais, coleta e preparo dos espécimes	62
4.2.5 Metodologias para Avaliar a Formação Óssea e a Expressão Gênica do <i>RANK</i> , <i>RANK-L</i> e <i>OPG</i> após a ERM	63
4.2.5.1 Processamento Histológico	63
4.2.5.2 Determinação da distância entre os incisivos e largura da sutura palatina mediana	65
4.2.5.3 Análise da Expressão Gênica	66
4.2.5.3.1 Extração, Isolamento e Avaliação do RNA total	67
4.2.5.3.2 Análise da Expressão do mRNA pela PCR em Tempo Real	68
4.2.5.4 Expressão das Proteínas	69
4.2.5.4.1 Western Blotting	69
4.2.5.4.1.1 Extração e quantificação de proteína total	70
4.2.5.4.1.2 Preparo das amostras	70
4.2.5.4.1.3 Corrida das proteínas no gel de poliacrilamida e transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose	71
4.2.5.4.1.4 Imunomarcagem e a evidência das proteínas na membrana de nitrocelulose	72
4.2.6 Análise dos Resultados	73

4.2.6.1 Precisão da Metodologia (Calibração do examinador)	73
4.2.7 Análise Estatística.....	74
5. Resultado.	77
5.1 Análise Histológica	79
5.1.1 Mudança no espaço entre os incisivos	79
5.1.2 Mudança na largura da sutura (abertura da sutura)	81
5.1.3 Análise histológica descritiva	85
5.2 Análise do RNAm	99
5.2.1 RT-PCR.....	99
5.2.1.1 <i>RANK</i>	100
5.2.1.2 <i>RANK-L</i>	102
5.2.1.3 <i>OPG</i>	104
5.2.1.4 <i>VEGF</i>	106
5.2.2 Análise da expressão de proteína - Western Blotting	108
5.2.2.1 <i>RANK</i>	109
5.2.2.2 <i>RANK-L</i>	113
5.2.2.3 <i>OPG</i>	117
5.2.2.4 <i>VEGF</i>	121
6. Discussão.....	125
7. Conclusões	143
8. Referências	147
9. Anexo.....	155

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

O laser de baixa potência tem sido citado pelos seus efeitos bioestimulatórios em diversas situações clínicas, sendo efetivo na aceleração da cicatrização de tecidos moles e no controle de sintomatologia dolorosa crônica (MESTER et al., 1971; MESTER, MESTER & MESTER, 1985). Em Odontologia, o laser tem várias aplicações, podendo ser empregado como auxiliar terapêutico na hipersensibilidade dentinária, em lesões traumáticas da mucosa, gengivites, periodontites, pericementites, herpes simples entre outros (PINHEIRO et al., 1998; PINHEIRO & GERBI, 2006). Por sua atuação em tecido duro, acelerando a reparação óssea, o laser poderia ser empregado em tratamento dentário ortodôntico, extração dental, cirurgia ortopédica e implantes entre muitos outros procedimentos realizados na Odontologia que seriam beneficiados por seu potencial bioestimulatório (KAWASAKI & SHIMIZU, 2000).

Alguns estudos experimentais em animais e observações clínicas mostraram evidências de que a luz laser acelera o processo de reparação tecidual, induzindo a atividade mitótica celular, modificando a densidade capilar e aumentando a síntese de colágeno. O conhecimento do mecanismo da ação do laser no tecido ósseo é fundamental para que as aplicações clínicas tornem-se mais seguras e eficazes. Alguns autores trabalharam *in vitro* com osteoblastos isolados de calvária de ratos principal célula responsável na reparação óssea, submetidos ao laser de baixa potência (OSAWA et al., 1998; UEDA & SHIMIZU, 2001; UEDA & SHIMIZU, 2003). Estes estudos se correlacionam com outros *in vivo* que mostraram maior rapidez na recuperação de fraturas ósseas e aumento da reparação óssea em tratamentos ortopédicos respectivamente (TRELLES & MAYAYO, 1987; SAITO & SHIMIZU, 1997).

A Ortodontia tem como objetivo a correção das maloclusões esquelética e dentária utilizando forças ortodônticas e ortopédicas aplicadas no tecido ósseo. Estas forças desencadeiam diversas respostas nos tecidos tanto a nível histológico quanto molecular que resultará em remodelação óssea (MEIKLE, 2006). Sabe-se

que o tecido ósseo apesar de ser resistente às pressões difere em relação aos outros tecidos não somente pela sua estrutura físico-química, mas também pela capacidade extraordinária em desenvolver durante a vida pós-natal. O osso está em constante processo de reabsorção e formação, sendo capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta as diferentes forças, a que está sendo submetido (GARANT, 2003).

O processo de remodelação óssea foi dividido em estágios (HILL, 1998): 1) fase de repouso; 2) fase de reabsorção; 3) fase reversa; 4) fase de formação e 5) fase de repouso novamente. Em todas elas, a sequência de remodelação óssea consiste em diferentes processos subsequentes, incluindo o recrutamento de osteoblastos, formação de osteóide, mineralização e período de repouso. Após a aplicação de uma carga mecânica, mensagens secretadas pelos osteócitos atingem a superfície das células e uma resposta é formada pelas células ósseas em repouso.

1) Na fase de repouso as células do estroma, ativadas pelos osteócitos, produzem M-CFS (fator estimulante colônia de macrófagos) as quais estimulam a diferenciação celular em pré-osteoblastos. As células do estroma podem também dividir e produzir pré-osteoblastos que expressam o *RANK* ligante (*RANK-L* - Ligante do receptor ativador kappa β) em suas superfícies. O *RANK-L* ativa o receptor *RANK* (receptor ativador do fator nuclear kappa β) nas membranas dos pré-osteoclastos, causando a fusão dessas células em osteoclastos multinucleares maduros. Os osteoclastos maduros desenvolvem uma borda denteada e reabsorvem o osso. A *OPG* (osteoprotegerina) produzida pelos osteoblastos maduros podem se unir ao *RANK-L* e neste caso impedem a atividade dos osteoclastos.

2) Na fase de reabsorção os osteoclastos maduros reabsorvem o osso e formam uma lacuna de reabsorção na superfície da matriz óssea. Os novos osteoclastos são continuamente ativados e então começam a reabsorção, a qual leva aproximadamente duas semanas. Os osteoclastos são programados a morte ou apoptose.

3) durante a fase reversa seguinte, o recrutamento de osteoblastos ocorre através da diferenciação das células do estroma medular.

4) Na fase formativa, a ativa, a secreção dos osteoblastos formam uma camada de osteóide e preenche lentamente a cavidade de reabsorção (lacuna de reabsorção). Eles também secretam fatores de crescimento (FG), osteopontina (*OPN*), osteocalcina (*OCC*), *OPG* e outras proteínas. A maturação mineral que segue, é um longo processo que leva meses e resulta em aumento do número de cristais e osso.

5) Durante a fase de repouso final, uma vez

embebido no osteóide, os osteoblastos maduros se transformam em osteócito. A camada de osteoblastos, na superfície óssea neoformada é delimitada por células em repouso até a futura ativação dessas células (RUBIN et al, 2002; HARADA & RODAN, 2003; HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006).

Com o advento de novas tecnologias na área da Biologia Molecular, pesquisadores vêm tentando desvendar o processo de osteoclastogênese, analisando como ocorrem os fenômenos de formação e reabsorção óssea, como o acoplamento entre as células osteoclásticas, que expressam moléculas em sua superfície e os precursores dos osteoclastos que possuem moléculas receptoras. Também observaram que as células da linhagem osteoblástica, em condições fisiológicas normais regulam a diferenciação osteoclástica por meio de ligação das moléculas expressas na superfície dessas células resultando em osteoclastogênese (YASUDA et al., 1998a, YASUDA et al., 1998b; LOW et al., 2005; HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006).

O controle do ganho ou perda de massa óssea se baseia fundamentalmente em três moléculas reguladoras da osteoclastogênese (Figura 1): Osteoprotegerina (*OPG*), *RANK-Ligante* (*RANK-L*) sintetizadas por pré-osteoblastos e osteoblastos e *RANK* expresso nos precursores osteoclásticos (LACEY et al., 1994; AUBIN, 1998; YASUDA et al., 1998a, YASUDA et al. 1998b; DUCY, SCHINKE & KARSENTY 2000; HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006; SILVA & BRANCO, 2011). A osteoclastogênese começa com o estímulo das células hematopoiéticas que geram células mononucleares, que se diferenciam em osteoclastos imaturos. Os osteoclastos maduros se desenvolvem e se aderem as matrizes ósseas e secretam ácidos e enzimas que degradam o osso (OKAHASHI et al., 1998).

Há muitos genes envolvidos na proliferação, diferenciação e regulação dos osteoclastos. A diferenciação e função genética molecular do osteoclasto são mais simples do que do osteoblasto. Assim que a transcrição do osteoclasto maduro é atingida, a atividade de reabsorção óssea parece ser regulada pelo *RANK-L*. A *OPG* (osteoprotegerina) é um agente importante na diferenciação e função dos osteoclastos inibindo a atividade do *RANK-L* (HARADA & RODAN, 2003). A *OPG* bloqueia o fator de transcrição do *RANK* (NF- κ B) e *RANK-L* (RANK ligante). O *RANK* e o *RANK-L* são, portanto proteínas chaves na regulação da função dos

osteoclastos. A síntese do *RANK-L* pelos osteoblastos e seu papel em promover a diferenciação dos osteoclastos suporta a hipótese que os osteoblastos controlam a diferenciação dos osteoclastos (SILVA & BRANCO, 2011).

Figura 1 - Representação esquemática das principais vias de sinalização na regulação da remodelação óssea efetuada pelos pré-osteoblastos.

Portanto, o *RANK* e a *OPG* são muito importantes para atingir o equilíbrio no processo de remodelação. O *RANK-L* é expresso nos osteoblastos e exerce seu efeito unindo ao receptor *RANK* das células osteoclásticas (TEITELBAUM & ROSS, 2003). Esta união leva a uma rápida diferenciação dos precursores dos osteoclastos em osteoclastos maduros. A *OPG* regula negativamente a osteoclastogênese. Ela age como um receptor decodificador, produzida pelas células osteoblásticas, e compete com o *RANK* impedindo a ligação do *RANK* com o *RANK-L*. O efeito biológico da *OPG* nas células ósseas inclui a inibição dos estágios finais de diferenciação dos osteoclastos e indução de apoptose. Então a remodelação óssea é controlada pelo equilíbrio entre *RANK/RANK-L/OPG*, onde o *RANK-L* age positivamente, induzindo a diferenciação terminal dos osteoclastos e a sua ativação, e a *OPG* regula negativamente ligando-se ao *RANK-L*, inibindo o "turnover" ósseo pelos osteoclastos (HARADA & RODAN, 2003; OGASAWARA et al., 2004; ZHANG et al., 2008; KIDD et al., 2010).

Além dessas proteínas, o fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*) é expresso e ativado durante o desenvolvimento e o reparo ósseo (FOLKMAN & KLAGSBRUN 1987a; FOLKMAN & KLAGSBRUN 1987b; FERRARA, GERBER &

LECOUTER, 2003). O *VEGF* é o regulador mais importante tanto da neovascularização fisiológica quanto da patológica. O fato de o *VEGF* ser um mitógeno relativamente específico para células endoteliais vasculares permite uma resposta angiogênica pronunciada numa variedade de modelos *in vivo*.

Sabe-se que a formação óssea depende do suprimento sanguíneo, e que o tecido ósseo, é uma fonte rica em fatores angiogênicos e de crescimentos endotelial e ósseo (GARANT, 2003). O osso é geralmente revestido por duas camadas, uma externamente pelo periósteo, cuja função é distribuir o suprimento sanguíneo e nervoso para o osso, e a outra internamente, endósteo, constituído por camada celular e vascular, que contém células osteoprogenitoras (osteogênicas), revestindo as cavidades do osso esponjoso (cavidade medular), os canais de Havers e os de Volkman, por onde passam os vasos sanguíneos e os nervos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Durante a remodelação óssea, o periósteo está ativo, caracterizando por uma camada celular mais exuberante, formada por várias camadas de células em proliferação, sendo que as mais internas ou estão em processo de ativação ou são osteoblastos ativos (BILEZIKIAN, RAISZ & RODAN, 1996). Portanto, assim quando ocorrem alterações vasculares após ser submetido à força ortodôntica no tecido mineralizado, os processos de remodelação óssea são iniciados pelos osteoblastos e osteoclastos, reabsorvendo osso nas áreas sob pressão e formando osso nas áreas de tração (BILEZIKIAN, RAISZ & RODAN, 1996), sendo que um dos mais importante e essencial regulador da angiogênese e hematopoiese é o *VEGF* expresso e ativado durante o desenvolvimento e o reparo ósseo (FOLKMAN & KLAGSBRUN 1987a; FOLKMAN & KLAGSBRUN 1987b; FERRARA, 1996; FERRARA & DAVIS-SMYTH, 1997; FERRARA et al., 2003).

O *VEGF* é o regulador mais importante tanto da neovascularização fisiológica quanto da patológica. O fato de o *VEGF* ser um mitógeno relativamente específico para células endoteliais vasculares permite uma resposta angiogênica pronunciada numa variedade de modelos *in vivo*. O *VEGF* apresenta inúmeras funções como o fornecimento de nutrientes e oxigênio para os tecidos em desenvolvimento; estimula as células endoteliais na degradação da matriz extracelular; participa na proliferação e migração das células endoteliais,

principalmente em casos de reparo tecidual; no processo de inflamação; adaptação das integrinas aos receptores de *VEGF*; promoção de diapedese através das células endoteliais e, além disso, também funciona como regulador da permeabilidade vascular, importante para o início da angiogênese (DVORAK et al., 1995a; DVORAK et al., 1995b; FERRARA & DAVIS-SMYTH, 1997; NOR & POLVERINI, 1999; FERRARA, GERBER & LECOUTER, 2003).

Outros pesquisadores também têm observado que, dentre as moléculas sinalizadoras, o *VEGF*, que é uma citocina angiogênica (mitogênica e vasoativa) tem ação direta sobre as células endoteliais, e desempenha uma função chave na regulação da interação osteogênese-angiogênese, estimulando a migração e a diferenciação de osteoblastos (FURUMATSU et al., 2003; TARKKA et al., 2003). Este fator ainda atua no crescimento, no recrutamento, sobrevivência, atividade e diferenciação dos osteoclastos (NIIDA et al., 1999; ENGSIG et al., 2000; NAKAGAWA et al., 2000; KOHNO et al., 2003). Portanto, o sistema vascular, necessário para suprir as células indiferenciadas e um suprimento abundante de sangue, é visto nos locais de rápida reabsorção e aposição óssea.

Kohno et al., em 2003, observou em seus estudos que o *VEGF* possui a capacidade de ativar os osteoclastos bem como a neovascularização e, durante o movimento dentário ortodôntico, os osteoblastos produzem *VEGF* “*in vitro*” ativando a remodelação no tecido periodontal, mostrando que a atividade osteoblástica pode apresentar estreita relação com a angiogênese, o qual é a principal função do *VEGF*.

Até o momento, pela literatura pesquisada tem sido sugerido que o sistema *RANK*, *RANK-L* e *OPG* desempenha um papel importante na remodelação óssea, sendo, portanto fundamental o seu conhecimento dentro da Odontologia (LOW et al., 2005; NISHIJIMA et al., 2006). A participação das proteínas *VEGF*, *RANK*, *RANK-L* e *OPG* na formação óssea já foram estudados durante o desenvolvimento dos ossos longos ou em processos patológicos em modelos animais geneticamente modificados.

Estudos têm sido realizados em relação *RANK/RANK-L* durante a movimentação dentária experimental (KANZAKI et al., 2001), mas não existe

nenhum trabalho relacionando o *RANK*, *RANK-L*, *OPG* e *VEGF* juntas quando da aplicação de uma força ortopédica, como no caso da expansão rápida da maxila (ERM) e aplicação do laser de baixa potência (LBP), para estimular o reparo ósseo.

Existem inúmeros estudos que envolvem a ERM, porém são a nível radiográfico e/ou histológico, mas sabemos que há necessidade de aprofundarmos o nosso conhecimento no assunto a fim de esclarecer a contribuição dessas proteínas na Odontologia, bem como verificar a ação do LBP na expressão dessas proteínas ósseas durante o processo de remodelação óssea. Como a literatura tem mostrado que o laser de baixa potência induz a formação de tecido ósseo, a atual pesquisa teve como objetivo correlacionar os eventos celulares e teciduais com a expressão das proteínas *RANK*, *RANK-L*, *OPG* e *VEGF* durante a osteogênese induzida após a disjunção maxilar e aplicação do LBP, em ratos.

2. Revista da Literatura

2. REVISTA DA LITERATURA

2.1 Biologia do Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um dos mais resistentes e rígidos do corpo humano especializado em suportar pressões. Constituinte principal do esqueleto serve de suporte para as partes moles e protege órgãos vitais, como os contidos nas caixas craniana e torácica e no canal raquidiano. Além dessas funções, proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, e constitui um sistema de alavanca que amplia as forças geradas na contração muscular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Como outros tecidos conjuntivos de sustentação, o osso é composto de células e matriz extracelular que contém substância fundamental orgânica e fibras colágenas. Essa matriz orgânica constitui 33% do tecido ósseo, dos quais 28% são colágenos e os 5% restantes são proteínas não colágenas, incluindo osteonectina (*ONC*), osteocalcina (*OCC*), osteopontina (*OPN*), proteína óssea morfogenética, glicoproteínas, proteoglicanos e sialoproteína óssea (*BSP*) que se dispõe formando os ossos, estruturas rígidas e resistentes, que formam o esqueleto (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; KATCHBURIAN & ARANA, 1999; GARANT, 2003).

O colágeno do osso representa cerca de metade do colágeno total do corpo humano e está representado quase que exclusivamente na forma de fibras colágenas do tipo I. Tanto o colágeno quanto os demais constituintes da matriz orgânica são sintetizados pelo retículo endoplasmático dos osteoblastos. Após a fase de maturação, sais amorfos de fosfato de cálcio começam a precipitar na área do colágeno. Tais focos de mineralização expandem-se e se unem em cristais de hidroxiapatita para a futura mineralização. O componente mineral do osso é constituído basicamente por cálcio e fosfato, na forma de cristais de hidroxiapatita o que confere ao osso rigidez. Portanto, a substância inorgânica da matriz óssea é composta por cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Estes cristais mantêm relação direta com o colágeno e colocam-se paralelamente ao seu eixo longitudinal,

devido às forças ou ainda por ligações físicas diretas. A associação de hidroxiapatita com as fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência característica do tecido ósseo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; KATCHBURIAN & ARANA, 1999).

O fato de a matriz extracelular ser mineralizada confere a esse tecido as propriedades ideais para a realização das funções de suporte e proteção do organismo vertebrado. Além dessa propriedade mecânica, o osso também apresenta uma função metabólica no equilíbrio da homeostasia mineral (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; KATCHBURIAN & ARANA, 1999). A quantidade de tecido ósseo presente durante o crescimento fisiológico e a remodelação do esqueleto é determinada pelo equilíbrio entre a taxa de formação e a reabsorção óssea. Entrelaçados no interior da rede de colágeno, a capacidade de expansão osmótica ou eletrostática dos proteoglicanos fornece uma matriz extracelular com elasticidade para suportar forças de compressão e cisalhamento. O último passo, entretanto, para a confecção de um material sólido, é a mineralização. No osso a formação de ligações intercelulares, via processos citoplasmáticos, permite o transporte de metabólitos desde as células basais presentes na superfície até os osteócitos mais internos, favorecendo o aumento da densidade mineral (GARANT, 2003).

O termo "formação óssea" é algumas vezes, empregado para descrever a diferenciação dos osteoblastos durante o desenvolvimento embriogênico, mas o termo, mais precisamente, refere-se com exclusividade à função osteoblástica; em outras palavras, a síntese e a deposição de matriz óssea extracelular. Porém as funções dos osteoblastos e dos osteoclastos estão intimamente relacionadas. Durante o desenvolvimento do esqueleto e durante toda a vida, células da linhagem dos osteoblastos sintetizam e secretam moléculas que, em troca, controlam a diferenciação dos osteoclastos. Esta é uma interação direta e que já foi bem estabelecida *in vivo*. Uma vez que os osteoblastos e osteoclastos estejam bem diferenciados, há uma menor relação direta entre ambos. O osso está constantemente sendo reabsorvido pelos osteoclastos e, posteriormente reposto pelos osteoblastos, em um processo fisiológico denominado remodelação óssea, a qual é fortemente regulada por fatores locais (autócrino e/ou parácrino) e endócrinos (DUCY, SCHINKE T & KARSENTY, 2000).

O osso é formado pelos osteoblastos que derivam de células mesenquimais primitivas, chamadas células osteoprogenitoras e que ocupam todos os locais ativos da formação óssea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; KATCHBURIAN & ARANA, 1999; GARANT, 2003). O potencial osteogênico dessas células depende de fatores genéticos e de numerosos fatores indutores (humorais e locais). Seja qual for o fator que induz a ativação das células mesenquimais, elas proliferam e se agrupam na presença de uma intensa rede capilar, constituindo as chamadas "membranas ósseas". Dessa maneira, elas se transformam em células osteogênicas ou pré-osteoblastos. Tem como funções a síntese e secreção da parte orgânica da matriz óssea (osteóide) e a participação do início do processo de mineralização dessa matriz, e, estão alinhadas ao longo das superfícies ósseas (BARTOLD, 1998; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; KATCHBURIAN & ARANA, 1999; GARANT, 2003). Numa fase inicial de mineralização, chamada fase primária, a deposição de mineral é rápida, entre 6 a 12 horas, e cerca de 60% a 70% da mineralização está completa. A mineralização subsequente (fase secundária) se processa lentamente, completando-se somente depois de vários meses. Os osteoblastos regulam não somente a formação óssea, mas também a reabsorção óssea através da sinalização que controla a diferenciação e atividade dos osteoclastos (*RANK-L/OPG*) que será detalhada posteriormente (ROBLING, CASTILLO & TURNER, 2006).

Uma vez diferenciados, os osteoblastos passam a sintetizar e secretar as moléculas da matriz orgânica, do futuro osso principalmente colágena, e também a funcionar como transmissores de sinais para a remodelação óssea. Estas células possuem fatores para receptores de hormônios como os da paratireoide (*PHT*), estrógenos, insulina dentre outros. Vários fatores locais como prostaglandinas (*PGE₂*), citocinas e interleucinas também agem em relação à proliferação, diferenciação e atividade dos osteoblastos através de fatores reguladores. Além dos componentes já descritos, o tecido ósseo também possui determinados polipeptídeos com ação semelhante aos hormônios e as citocinas, que são os Fatores de Crescimento. Estes fatores regulam a função local das células ósseas, estimulando diversos eventos celulares, como a quimiotaxia, proliferação, diferenciação e produção de proteínas da matriz extracelular. Eles também estão armazenados na própria matriz do tecido ósseo e atuam por meio de união com receptores

específicos presentes nas superfícies celulares (GARANT, 2003; ROBLING, CASTILLO & TURNER, 2006).

Os osteoblastos expressam receptores da vitamina D₃ (1,25 diidroxivitamina D₃) e PHT (paratormônio), dois hormônios que ativam a reabsorção óssea e mobilização de cálcio. Eles induzem mudança no citoesqueleto dos osteoblastos produzindo uma mudança na forma dessas células. A contração dos osteoblastos e/ou células de revestimento ósseo em resposta ao PHT e vitamina D₃ aumenta a largura do espaço intercelular e expõe mais a superfície do osteóide ao fluido intersticial, e isto parece ser um dos primeiros eventos da parada da deposição de matriz óssea e ativa uma resposta dos pré-osteoclastos (BERTOLAMI & BRONSON, 1989; GARANT, 2003).

Entre os principais fatores de crescimento encontrados no tecido ósseo secretados pelos osteoblastos estão: Fatores de Crescimento de Fibroblastos (*FGF*) que são mitogênicos para osteoblastos e aumentam a síntese de proteínas colágenas; Fatores de Crescimento Semelhante à Insulina (*IGF-1*) cuja produção é estimulada por hormônios sistêmicos, como hormônio do crescimento, hormônios sexuais e fatores locais, como prostaglandinas; Fator de crescimento de transformação alfa (*TGF-α*), Fator de Crescimento de Transformação Beta (*TGF-β*), Fator de Crescimento Tumoral (*TNF*), Fatores de Crescimento Derivado de Plaquetas (*PDGF*) e Proteínas Ósseas Morfogenéticas (BMP). Estes fatores de crescimento, citocinas e hormônios podem agir de modo autócrino (para regular a atividade da própria célula que a produz) ou de modo paracrino (para influenciar outras células, principalmente os osteoclastos) ou podem ser incorporados à matriz óssea para ação posterior. Durante a reabsorção óssea osteoclástica, estes fatores de crescimento podem ser liberados da matriz óssea e ativados exercendo um efeito regulatório paracrino ou autócrino nas células osteogênicas e osteoclastos, o que será discutido posteriormente (GARANT, 2003).

Os osteócitos também apresentam a mesma origem que os osteoblastos, sendo encontrados dentro das lacunas ósseas. São simples osteoblastos inativos, incorporados dentro da matriz óssea, recentemente, depositada por eles, quando ainda eram osteoblastos. São essenciais para a manutenção da matriz óssea auxiliando na nutrição da mesma e contribuindo para a homeostase do cálcio

sanguíneo. Os osteócitos estão contidos em espaços lacunares preenchidos com fluído ósseo, fibras colágenas desmineralizadas e proteoglicanos. Uma vez que eles se tornam totalmente embebidos na matriz óssea os osteócitos exibem capacidade sintética e secretora diminuída (BERTOLAMI & BRONSON, 1989; BILEZIKIAN, RAISZ & RODAN, 1996). Os osteócitos desenvolvem muitos processos citoplasmáticos principalmente em direção aos osteoblastos superficiais e células ósseas de repouso, onde o suprimento nutricional é alto. Tem sido sugerido que os osteócitos mobilizam o cálcio e outros íons da matriz óssea e os transportam via processo celular e canalículos para os osteoblastos (e células ósseas de revestimento) para intercâmbio com fluídos corpóreos gerais da superfície óssea (BERTOLAMI & BRONSON, 1989; BILEZIKIAN, RAISZ & RODAN, 1996).

Recentes experimentos em cultura de osteócitos têm identificado uma função mecanosensora dessas células em sentir o fluxo do fluído ósseo durante a deformação óssea (células sensitivas a pressão). Os osteócitos agem como transdutores, convertendo mudanças físicas em químicas que modulam a atividade de remodelação óssea dos osteoblastos e osteoclastos locais. A maioria dos osteócitos responde indiretamente ao fluxo do fluído extracelular causado pela carga. Agindo desta forma, os osteócitos podem iniciar alterações locais da forma e da massa óssea (ROBLING, CASTILLO & TURNER, 2006; BERTOLAMI & BRONSON, 1989; BILEZIKIAN, RAISZ & RODAN, 1996; BURGER et al.,1995; ROBLING, BURR & TURNER, 2001).

Os osteócitos são as células mais abundantes no osso e as células ósseas de revestimento são as segundas mais abundantes. Elas recobrem mais de 90% da superfície do osso adulto e se caracterizam por possuir uma forma achatada e revestir a superfície óssea. Sob a camada de células ósseas de revestimento, o osteóide é substituído por uma estreita zona de tecido conjuntivo. Estas células agem como uma barreira, protegendo a superfície óssea da ação dos osteoclastos, regulando a composição iônica do fluído ósseo e regulando o início da nova formação ou reabsorção óssea. Elas têm o potencial de comunicar com os osteócitos e osteoblastos, via junções comunicantes e, podem também responder ao estímulo mecânico (MILLER & JEE, 1992; PARFITT, 1994).

Os osteoclastos originam-se a partir das células do sistema macrófago-monócito (sistema hematopoiético do osso trabecular) que dão origem às células da linhagem dos monócitos e macrófagos (TEITELBAUM, 2000). São células móveis altamente especializadas em reabsorção da matriz óssea através de secreções coordenadas de íons hidrogênio e enzimas proteolíticas (ROODMAN, 1998). Em lâminas teciduais os osteoclastos são identificados por sua aparência multinuclear, expressão de receptores de calcitonina e coloração positiva para a fosfatase ácido târtaro-resistente (TRAP). Participam juntamente com os osteoblastos do processo de remodelação constante do osso. Quando em atividade, os osteoclastos repousam sobre a superfície do osso e, através de erosão pela ação enzimática forma uma depressão pouco profunda conhecida como Lacuna de Howship ou lacuna de reabsorção (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; GARANT, 2003).

A reabsorção óssea osteoclástica é caracterizada por uma modificação na forma e da massa do osso a uma adaptação ao estresse físico exercido no esqueleto. Em condições inflamatórias patológicas, tais como doença periodontal, a atividade osteoclástica é iniciada em resposta aos fatores estimulatórios produzidos pelas células do infiltrado inflamatório. A prostaglandina (PGE_2) e fatores ativadores de osteoclastos (Interleucina-1 β) são duas substâncias geradas no tecido inflamatório que exibem potencial para ativar a atividade dos osteoclastos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; GARANT, 2003).

Na remodelação óssea a fase de reabsorção é seguida por uma fase de formação óssea. A fase de reabsorção do ciclo de remodelação-reabsorção do osso leva aproximadamente de 8 a 10 dias. Este é o ciclo de vida dos osteoclastos multinucleares que sofrem apoptose, um processo que envolve condensação da cromatina e fragmentação de DNA (OKAHASHI et al., 1998).

Em sua forma multinuclear e totalmente diferenciada, os osteoclastos são facilmente identificados em cortes histológicos. Situado na superfície óssea, ele ocupa uma cavidade (lacuna de Howship) criado por sua atividade secretória polarizada ou pode tampar a superfície de reabsorção. Uma grande área criada pelas invaginações da membrana citoplasmática, em forma de borda denteada, caracteriza a superfície apical secretória do osteoclasto voltada para o osso. A presença de bordas denteadas é uma indicação que os osteoclastos estão

ativamente engajados na reabsorção óssea. Grandes osteoclastos podem ter várias bordas denteadas ao longo de sua superfície apical. Cada conjunto de borda denteada é circundado por uma zona clara (ou zona seladora) uma área citoplasmática rica em filamento de actina citoplasmática. A zona clara estabelece um selamento entre o compartimento de reabsorção óssea e o fluído intersticial, permitindo uma íntima adaptação da célula na superfície óssea (HOLTROP & KING, 1977; BARON et al., 1993).

A zona clara delimita a membrana plasmática apical (borda denteada) da membrana plasmática baso-lateral. A membrana baso-lateral está especializada para a interação com o tecido conjuntivo adjacente. Ela contém receptores para hormônios e outros fatores de crescimento, como o *RANK*, que influencia no controle da atividade osteoclástica. Este local, com vários sistemas de transporte da membrana, é necessário para manter o equilíbrio eletrolítico fisiológico dentro da célula (SALO et al., 1996).

Os osteoclastos maduros aderidos à matriz óssea secretam ácido e enzimas que degradam o tecido ósseo em um compartimento extracelular (OKAHASHI et al., 1998). Porém para cada passo da osteoclastinogênese, fatores estimulantes específicos precisam estar presentes, tais como a Proteína ativadora de transcrição-1 (*AP-1*), fator estimulante de colônia de monócito-1 (*CSF-1*), fator estimulante da colônia de macrófago (*M-CSF*), fator de diferenciação de osteoclastos (*ODF*), interleucinas (*IL*), vitamina D₃, Ligante do receptor ativador kappa β (*RANK-L*), fator de necrose tumoral (*TNF*), e contato com partículas de osso mineralizado contendo osteocalcina (FELIX et al., 1994; NISHIHARA et al., 1994; OWENS et al., 1996; PERKINS & KLING, 1995; QUINN et al., 1998).

A composição orgânica da matriz óssea extracelular do osso é feita através de proteínas colágenas e não colágenas e proteoglicanos. O colágeno tipo I é o maior componente da matriz orgânica do osso. Ele constitui cerca de 90% da proteína óssea e fornece uma estrutura de suporte para a fase mineral. A função das proteínas não colágenas no osso é: mineralização da matriz óssea, adesão celular e regulação da atividade óssea celular durante a remodelação óssea. Elas têm sido localizadas e quantificadas no tecido humano por técnicas de imunohistoquímica e as principais são: lâminas limitantes e linhas de cimento; proteínas não colágenas

(Sialoproteína óssea (*BSP*); osteocalcina (*OCC*), osteopontina (*OPN*) e a osteonectina (*OCN*). Os fatores de crescimento e citocinas reguladoras da formação de osteoclastos também são depositados na matriz óssea, e os principais fatores de crescimento são: fator de crescimento de transformação β (*TGF- β*), fator estimulante de colônia de monócitos-1 (*CSF-1*), fator estimulante de colônia de granulócito (*G-CSF*), fator de crescimento de fibroblastos (*FGF*) e fator de crescimento semelhante insulina (*IGF*) (GARANT, 2003).

2.2 Remodelação óssea sincronizada

A remodelação óssea em resposta as forças ortodônticas e/ou ortopédicas requer uma ação sincronizada dos osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células do tecido conjuntivo. A comunicação célula-célula é um fator importante do mecanismo de transdução entre a força (aplicada ao dente e/ou osso) e a remodelação óssea.

2.2.1 Sistema *OPG/RANK/RANK-L* na ativação dos osteoclastos e remodelação óssea

A resposta da remodelação óssea que caracteriza a movimentação dentária ortodôntica e alterações ortopédicas necessita de uma função coordenada dos osteoblastos e dos osteoclastos. Essas células e seus precursores comunicam-se via mensagens químicas, através dos fatores conjuntos ou fatores de acoplamento. Já foi bem definido que os osteoblastos controlam as funções dos osteoclastos através dos fatores parácrinos e endócrinos. Assim, fatores osteolíticos como: o paratormônio (PTH), a vitamina D₃ (1,25-DHCC), a prostaglandina E₂ (*PGE2*) e a interleucina (*IL-1*); agem nos pré-osteoblastos determinando a secreção de fatores acopladores, que, por sua vez, agem nos precursores osteoclásticos (TRAP⁻), diferenciando-os em osteoclastos (TRAP⁺) e ativando-os para a reabsorção óssea (MURRAY et al., 1994).

Embora vários hormônios e citocinas participem da regulação do mecanismo de formação e ativação de osteoclastos, as duas moléculas efetoras finais, produzidas pelos pré-osteoblastos, são o *RANK-L*, também conhecido como ligante de osteoprotegerina (*OPG-L*) e a osteoprotegerina (*OPG*). Portanto, o *RANK-L* e seus dois receptores *RANK* (produzido pelos osteoclastos) e *OPG* (produzidas pelos osteoblastos) estão envolvidos no processo de remodelação óssea (ALHASHIMI et al., 2001).

A reabsorção óssea é um processo muito mais rápido do que o processo de aposição. Há pelo menos 24 genes e 60 proteínas envolvidas na regulação da osteoclastogênese e função dos osteoclastos, entre elas encontram-se o *RANK*, *RANK-L* e *OPG*, que participam das vias de sinalização, na regulação da remodelação óssea, sendo as proteínas chaves na regulação da função dos osteoclastos (BOYLE et al., 2003; KARSENTY, 2003; MASELLA & MEISTER, 2006).

A identificação dessas moléculas foi feita aproximadamente há 10 anos. O grupo de pesquisadores de Amgen, em busca da identificação de moléculas receptoras relacionadas ao *TNF* para uso terapêutico, demonstrou a existência de uma molécula receptora similar ao gen do *TNF*, responsável por acentuado quadro de osteoporose em camundongo transgênico. Experimentos complementares revelaram que a osteoporose está associada com a diminuição da osteoclastogênese e da ativação dos osteoclastos e a molécula "protetora-óssea" foi então denominada de osteoprotegerina (*OPG*). Na mesma época no Japão, alguns trabalhos (YASUDA et al., 1998a, YASUDA et al. 1998b) pesquisando os efetores inibitórios e estimulatórios dos osteoclastos encontraram uma proteína inibitória da osteoclastogênese nas células estromais da medula óssea, que foi denominada de fator inibitório da osteoclastogênese (*OCIF*). Análises subsequentes revelaram que a *OPG* e a *OCIF* eram idênticas (YASUDA et al., 1998a, YASUDA et al. 1998b). Sequencialmente, estes grupos de pesquisas identificaram o ligante da proteína *OPG*, que inicialmente foi denominado, respectivamente, de ligante da osteoprotegerina (*OPG-L*) também conhecido como *RANK-L* e fator de diferenciação de osteoclastos (*ODF*).

O terceiro protagonista desta tríade é o receptor ativador do NF- κ B (*RANK*) ou receptor do fator de diferenciação de osteoclasto (*ODF*) ou receptor da citocina

que induz a ativação relacionada ao *TNF* que, é uma proteína transmembrana com um grande domínio intercitoplasmático-C e um domínio extracelular-O e, ainda um domínio rico em cisteína envolvido na sua dimerização (GARANT, 2003).

Os osteoclastos se diferenciam a partir de células precursoras hematopoiéticas presentes na medula óssea, baço e sangue periférico. Porém o desenvolvimento dos osteoclastos a partir de seus precursores, geralmente necessita da presença dos osteoblastos, cuja função não está restrita à formação óssea, mas também ao início da reabsorção óssea, promovendo um estímulo essencial e suficiente que controla o comportamento dos osteoclastos, um evento que ocorre via interação célula-célula (HUGHES & KING, 1998; LERNER, 2000). Portanto os determinantes moleculares dessa interação são dois fatores produzidos por células da linhagem osteoblástica, *RANK-L* e *OPG*. O *RANK-L* age diretamente na diferenciação dos macrófagos em osteoclastos. Eles estão envolvidos na reabsorção óssea, osteoclastogênese e perda óssea. A *OPG*, também conhecida como fator inibitório da osteoclastogênese, é um antagonista do *RANK-L*, e trabalha se unindo ao receptor do *RANK* nos osteoblastos e células estromais, bloqueando assim a ligação *RANK/RANK-L*. Isto tem o efeito de inibir a diferenciação do precursor dos osteoclastos em osteoclastos maduros, diminuindo a reabsorção óssea (RUBIN et al., 2002).

Os osteoclastos são células especializadas multinucleadas que tem a capacidade única de realizar a reabsorção óssea lacunar. Os precursores mononucleares dos osteoclastos são derivados de células do tronco hematopoiéticas. A formação dos osteoclastos envolve um processo de múltiplos estágios nos quais existe a perda do marcador de macrófago/monócito e o ganho de marcadores de osteoclastos e ocorre quase sempre dentro do microambiente ósseo e a diferenciação do precursor do osteoclasto em osteoclasto maduro requer fator estimulatório de colônia de macrófagos (*M-CSF*) e do ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa β (*RANK-L*). O *M-CSF* induz a expressão do receptor *RANK-L*, o *RANK* que, quando interage com o *RANK-L* presente na membrana dos precursores de osteoblastos circundantes produz um sinal essencial que promove a sua diferenciação e a ativação dos osteoclastos maduro para a reabsorção óssea (YASUDA et al., 1998a). A *OPG*, *RANK* e *RANK-L* são produzidos por inúmeros tipos celulares e por uma variedade de tecidos, sendo mais estudado durante a

osteoclastogênese (THEOLEYRE et al., 2004). Mais detalhes dessas proteínas serão descritos a seguir.

2.2.1.1 *RANK-L*

O *RANK-L* (fator ativador-receptor nuclear Kappa β) também é conhecido como *TNFSF-11* ou fator de diferenciação de osteoclasto (*ODF*), é uma proteína membro da superfamília de ligantes do fator de necrose tumoral (*TNF*) liberadas pelos osteoblastos ou células mesenquimais osteoprogenitoras (YASUDA et al., 1998a). É expressa como uma proteína ligada à membrana (*mODF*) de pré-osteoblastos, osteoblastos e de linfócitos-T ativados (contato célula a célula), ou na forma solúvel (*sODF*). Existem três isoformas de *RANK-L*: duas moléculas transmembrana (*mRANK-L* ou *mODF*), o *RANK-L1* e *RANK-L2*, sendo que, o *RANK-L2* tem apenas um pequeno domínio intracelular e o *RANK-L3* que não apresenta domínio transmembrana e corresponde a forma solúvel do *RANK-L* (*sRANKL* ou *sODF*). Todas as três formas protéicas tem participações similar na biologia do osteoclasto, porém tem sido proposto que, a forma solúvel do *RANK-L* (*sRANK-L* ou *RANK-L3*) apresenta maior atividade (ODGREN et al., 2001).

O *RANK-L* exerce suas funções quando se liga ao *RANK* (expresso na membrana das células da linhagem osteoclástica), de maneira parácrina, produzindo sinais de transdução ativando o fator nuclear- $\kappa\beta$ (*NF- $\kappa\beta$*) nos pré-osteoclastos levando a formação de osteoclastos maduros (HOFBAUER et al., 2000; NAKAGAWA et al., 1998) para a remodelação óssea em resposta aos estímulos mecânicos (aplicação de força ortodôntico e/ou ortopédica). A ligação *RANK/RANK-L* resulta em rápida diferenciação e fusão de precursores de osteoclastos hematopoiéticos em osteoclastos maduros promovendo assim reabsorção óssea, e a inibição ou redução de apoptose de osteoclasto maduro. Portanto a ligação entre *RANK-L* e *RANK* induz a osteoclastogênese, ativando os osteoclastos maduros, controlando a sua inserção no osso e promovendo a sua sobrevivência. A diferenciação osteoclástica pode ser inibida tanto *in vivo*, como *in vitro* quando a ligação *RANK-L* com o *RANK* é impedida. Isso ocorre quando o *RANK-L* passa a

ligar-se a outra proteína circulante, a Osteoprotegerina (*OPG*), que é expressa na membrana plasmática dos pré-osteoblastos, osteoblastos e células do estroma, pertencente à superfamília dos receptores dos fatores de necrose tumoral (*TNF*) (MEIKLE, 2006).

Portanto, a atividade do *RANK-L* está fisiologicamente regulada pelo receptor alvo osteoprotegerina (*OPG*) que, por sua vez tem sua expressão regulada negativamente pela *PGE₂*, e regulada positivamente pelo estrogênio. A proporção do *RANK-L* e da *OPG* pode modular a capacidade destas células em estimular a diferenciação e atividade osteoclástica, bem como a taxa de reabsorção óssea. O *RANK-L* é uma das moléculas regulatórias principais na formação dos osteoclastos (quando se unem ao *RANK*), mas podem também se unir a *OPG*, levando a apoptose dos osteoclastos. O *RANK-L* e seus dois receptores, *RANK* e *OPG*, são muito importantes para atingir o equilíbrio no processo de remodelação óssea (YASUDA et al., 1998a ; YASUDA et al. 1998b).

Muitos fatores podem estimular a expressão do *RANK-L* como o hormônio paratireoidiano (*PHT*), a prostaglandina (*PGE₂*), dexametasona, citocinas inflamatórias como a interleucina-1 (*IL-1*), o fator de necrose tumoral- α (*TNF- α*) e a vitamina D3. Em contraste, o estrógeno ou o *TGF- β* atenua a expressão do *RANK-L*. Notadamente, a expressão destes fatores tem atuação oposta para a expressão da *OPG* (SUDA et al., 1997). Nas células tumorais malignas a desregulação de muitas citocinas e hormônios podem regular o "turnover" ósseo via expressão de *RANK-L*, levando a destruição óssea (GARANT, 2003).

2.2.1.2 *OPG*

A expressão de RNAm da *OPG* tem sido detectada no osso, cartilagem, aorta, pele, pulmão, coração, rim, fígado, cérebro e em vários outros tecidos. Num nível celular, a *OPG* é expressa pelos osteoblastos, fibroblastos, células precursoras, endoteliais, dendríticas, linfóides e da musculatura aórtica (LERNER, 2000). A *OPG* é secretada pelos membros do receptor da superfamília *TNF* que regula negativamente a osteoclastinogênese. Tem sido sugerido que a *OPG* existe

tanto ligada à membrana como em forma solúvel, porém após a clivagem, a *OPG* perde seus domínios transmembrana e citoplasmático, sendo liberada como uma proteína solúvel por células estromais e/ou osteoblastos que inibe a atividade do *RANK-L* (KATAGIRI & TAKAHASHI, 2002). Ela é uma glicoproteína produzida pelas células pré-osteoblastos e osteoblastos, em resposta a fatores osteotrópicos ou citocinas, agindo como um receptor alvo para o fator de diferenciação de osteoclastos (*RANK-L*) competindo com o *RANK* para união com o *RANK-L* desempenhando um importante papel na prevenção da reabsorção óssea. Ao se ligar ao *RANK-L*, bloqueia a ligação *RANK/RANK-L*, consequentemente, a osteoclastogênese é inibida (TEITELBAUM, 2000). O efeito biológico da *OPG* nas células ósseas, incluem inibição dos estágios terminais da diferenciação dos osteoclastos, supressão da ativação dos osteoclastos da matriz e indução de apoptose em osteoclastos ativos (LACEY et al., 1994; NAKAGAWA et al., 1998; BURGESS et al., 1999).

A administração *in vivo* da *OPG* ou a expressão maior do gene de *OPG* em camundongos transgênicos leva a uma severa osteopetrose secundária (aumento da densidade óssea e do volume ósseo a uma quase total ausência de osteoclastos), enquanto a diminuição da expressão do gene de *OPG* em camundongos causa severa osteoporose com perda do osso trabecular e diminuição da resistência óssea e hipercalcemia resultante do aumento da atividade osteoclástica (MIZUNO et al., 2000; KHOSLA, 2001). Em pacientes com osteoporose, artrite reumatóide e metástase ocorrem um desequilíbrio na tríade *OPG/RANK/RANK-L*, sendo atualmente alvo de estudo para possíveis aplicações terapêuticas. Além de outras alterações sistêmicas, visto que, estas moléculas também estão presentes em outros tipos celulares. O *RANK* e o *RANK-L* também podem afetar o sistema cardiovascular, devido provavelmente ao aumento no "turnover" ósseo e consequentemente da mudança na homeostasia do cálcio. Tem-se demonstrado que camundongos deficientes de *OPG* apresentam calcificação das artérias aorta e renal e pacientes com mutação no gene para *OPG* apresenta falência cardíaca.

Uma vez que a transcrição para osteoclastos maduros é atingida, a atividade de reabsorção parece ser regulada pelo *RANK-L*. Deste modo o estroma celular pode controlar a osteoclastogênese aumentando a expressão do *RANK-L* ou

diminuindo a expressão de *OPG* competitiva. Portanto a *OPG* é um falso receptor solúvel do *RANK-L* secretada pelos osteoblastos e as células estromais do tecido ósseo que, regula negativamente o *RANK-L*, pois, compete com o *RANK* pela ligação com o *RANK-L*, prevenindo a osteoclastogênese e inibindo o "turnover" ou remodelação óssea pelos osteoclastos (ROBLING, CASTILLO & TURNER 2006).

2.2.1.3 RANK

Outra importante proteína que participa das vias de sinalização na regulação da remodelação óssea efetuada pelos pré-osteoblastos é o *RANK*. É uma proteína transmembrana tipo I, receptora para o *RANK-L*, e expressa nos precursores osteoclásticos e em osteoclastos maduros, ativando a osteoclastogênese, além de ser expressa na membrana de outros tipos de células, como células dendríticas (OGASAWARA et al., 2004; KRISHMAN & DAVIDOVITCH 2006; KRISHMAN, PARK, DAVIDOVITCH, 2009).

Então a remodelação óssea é controlada por um equilíbrio entre a união *RANK/RANK-L* e a produção de *OPG* (OGASAWARA et al., 2004). A sinalização célula-célula pelo *RANK-L* é crucial para a indução da diferenciação dos osteoclastos (MEIKLE, 2006). Para isto ocorrer, requer não só a interação do *M-CSF* (Fator Estimulante de Colônia de Macrófagos) com seus receptores, mas também da ligação entre *RANK/RANK-L* na superfície das células precursoras dos osteoclastos, emitindo sinais que ativam os osteoclastos maduros (TEITELBAUM, 2000). Qualquer bloqueio nesta ligação provocada pela proteína *OPG* agindo como receptor alvo para o *RANK-L* resultará em inibição da osteoclastogênese (MEIKLE, 2006). O desequilíbrio apresentado entre as proteínas *RANK-L* e *OPG* pode estar envolvido na remodelação óssea, durante a movimentação dentária ortodôntica ou aplicação de forças ortopédicas (NISHIJIMA et al., 2006).

O mecanismo de controle da reabsorção óssea *OPG/RANK/RANK-L* e, portanto do movimento dentário ainda está sendo pesquisado. Vários estudos têm descrito que a aceleração do movimento dentário pela ativação dos osteoclastos. A presença do gene *RANK-L* no tecido periodontal ativa a osteoclastinogênese e

acelera a quantidade de movimento dentário experimental, enquanto que o gene *OPG* inibe a osteoclastinogênese mediada pelo *RANK-L* e o movimento dentário ortodôntico (KANZAKI et al., 2006). O movimento dentário experimental em ratos deficiente de *OPG* revelou um aumento marcado do número de osteoclastos no ligamento periodontal (LP) no lado de compressão e no osso alveolar adjacente. Estes animais também mostraram acelerada reabsorção osteoclástica, e o osso alveolar foi severamente destruído após a aplicação da força. Estes resultados sugerem que, durante o movimento dentário ortodôntico, *RANK-L* e *OPG* nos tecidos periodontais são importantes na regulação do equilíbrio da reabsorção óssea alveolar (LOW et al., 2005). Kanzaki e cols. (2004) reportaram que o gene *OPG* liberado no LP liga-se ao *RANK-L* inibindo a osteoclastinogênese e o movimento dentário em ratos. Forças de compressão aumentam significativamente o *RANK-L* e diminui a secreção de *OPG* em células do LP dependente do tempo e da magnitude da força (NISHIJIMA et al., 2006; YAMAGUCHI et al., 2006).

Estes relatos citados acima tornam claro que a remodelação óssea, particularmente a reabsorção óssea, é regulada pelas citocinas e proteínas liberadas em resposta a força ortodôntica e, que o estresse mecânico pode induzir a osteoclastinogênese através da regulação da expressão de *RANK-L* durante o movimento dentário ortodôntico. Porém, o número e distribuição do padrão de expressão de *RANK-L* e *RANK* nos osteoclastos mudam quando forças excessivas são aplicadas nos tecidos periodontais (AIHARA, 2005).

2.2.2 Aspectos gerais da angiogênese

O aumento da vascularização leva à cicatrização das feridas, acelera a integração dos enxertos, a remodelação óssea e assegura um novo fluxo sanguíneo para áreas de insuficiência vascular (AUERBACH et al., 1991). O mecanismo básico da angiogênese passa pelo entendimento de como as células endoteliais em determinado momento, são capazes de adquirir um fenótipo angiogênico. Os capilares sanguíneos são constituídos por células endoteliais e pericítos, os quais contêm informações genéticas para a formação de tubos, ramificações e redes

capilares. Em condições fisiológicas os pericítos mantêm a célula endotelial quiescente e evitam sua proliferação (FOLKMAN & SHING, 1992).

Os fatores de crescimento angiogênicos compreendem uma série de moléculas de natureza peptídica, que diferem entre si por suas propriedades bioquímicas e biológicas. De modo geral atuam diretamente nas células endoteliais estimulando sua proliferação ou, indiretamente, induzindo a liberação de outros fatores de crescimento, estes sim, com ação direta sobre as células endoteliais (NABEL et al., 1993). Alguns apresentam atividade exclusivamente angiogênica, como o *VEGF* (Fator de crescimento endotelial vascular) e outros exercem atividade pleiotrópica, como o *FGF* básico (Fator de crescimento de fibroblástico), que parecem atuar sinergicamente (PEPPER et al., 1992).

Angiogênese é um processo fundamental para a formação de novos vasos sanguíneos a partir de capilares pré-existentes. É um evento importante em vários fenômenos fisiológicos tais como no desenvolvimento embrionário, assim como nos patológicos, como a inflamação crônica e no reparo tecidual. Levando-se em conta essas condições, a angiogênese é altamente regulada, inicia-se sobre breves períodos e então é inibida completamente. Entretanto, muitas doenças são ocasionadas pela persistência do processo de angiogênese, devido à neovascularização desregulada (FOLKMAN & KLAGSBRUN, 1987a; FOLKMAN & SHING, 1992).

A angiogênese é essencial tanto para a fisiologia óssea normal quanto patológica. O processo de desenvolvimento ósseo e reparo dependem da adequada formação de novos capilares na área afetada a partir dos vasos sanguíneos existentes. A expressão de *VEGF* em osteoblastos e em células semelhantes é regulada por fatores de crescimento, citocinas pró-angiogênicas e inibidores da neovascularização pela ação de várias citocinas e fatores de crescimento, incluindo a *PGE*, *IGF*, *PGF* e vitamina D3 (BROGI et al., 1994; HARADA et al., 1994).

Os mediadores angiogênicos podem ser divididos em dois grupos: estimuladores e inibidores. A maioria das moléculas estimuladoras são proteínas e muitas delas são fatores de crescimento, moléculas de adesão celular, sinais de diferenciação, quimiotáticos e enzimas que participam do controle da formação de

um novo capilar. Os inibidores fornecem o equilíbrio requerido para manter a população de células endoteliais inativa, porém altamente responsiva através de sinais anuladores que, se ativados, podem levar a uma resposta angiogênica deletéria para o organismo. Eles são diversos em sua função e composição, agindo bloqueando ou atenuando a proliferação de células endoteliais, transdução sinalizadora, migração celular, expressão da metaloproteinase matricial, sobrevivência celular, desenvolvimento de precursor celular endotelial e ou recrutamento. Portanto, os fatores angiogênicos específicos podem iniciar este processo, enquanto que os fatores angiogênicos inibitórios desempenham função contrária. Essas moléculas com funções opostas agem continuamente com o intuito de manter a microvascularização quiescente (CARMELIET & COLLEN, 2000; KERBEL, 2000; POLVERINI, 2002).

Os fatores angiogênicos são classificados como direto e indireto. O fator angiogênico direto (*FGF*, *IL-8* e *VEGF*) tem a função de estimular a proliferação das células endoteliais e ou migração das mesmas. Quando o fator angiogênico não estimula as células endoteliais *in vitro*, ele é chamado fator angiogênico indireto uma vez que a proliferação endotelial e migração, observada *in vivo*, devem ter sido induzidas por algum outro fator ou célula, por exemplo, o macrófago. O macrófago, derivado de monócitos, é responsável por coordenar a formação e remodelação do tecido durante o processo de cicatrização. Ele libera *FGF* e *VEGF*, e sua atividade angiogênica ocorre em locais profundos do processo de cicatrização, quando a tensão de oxigênio é baixa e propicia o metabolismo anaeróbico (FOLKMAN & KLAGSBRUN, 1987a; FOLKMAN & SHING, 1992).

O *VEGF* também conhecido como fator de permeabilidade vascular, foi inicialmente isolado em fluídos tumorais e de culturas de células neoplásicas, sendo assim estabelecida a sua capacidade de induzir aumento da permeabilidade vascular. É produzido por vários tipos celulares, incluindo plaquetas, leucócitos, neutrófilos, queratinócitos, macrófagos, mastócitos e fibroblastos (NOR & POLVERINI, 1999).

O *VEGF* exerce ação mitógena específica sobre células endoteliais vasculares; modulando a expressão de muitas enzimas proteolíticas envolvidas no processo de angiogênese. O *VEGF* é encontrado em muitas áreas em tecidos

adultos, indicando que ele é provavelmente importante não somente no processo de angiogênese, mas também no processo de manutenção de vasos existentes. Estudos recentes tem enfatizado o papel do *VEGF* no crescimento celular endotelial, na prevenção de apoptose de células endoteliais e na formação vascular colateral (FERRARA 1996; FERRARA et al., 1997; FERRARA et al., 2003).

O *VEGF* foi localizado na membrana celular e em estruturas citoplasmáticas, denominadas organelas vesículo-vacuolares da célula endotelial. O mesmo também é conhecido por aumentar a permeabilidade vascular e estar envolvido na ocorrência e progressão do processo inflamatório. O *VEGF* é 50.000 vezes mais potente que a histamina na capacidade de aumentar a permeabilidade vascular (DVORAK et al., 1985; DVORAK et al., 1995a; DVORAK et al., 1995b). O aumento da permeabilidade induzido pelo *VEGF* estaria relacionado ao aumento funcional das organelas vesículo-vacuolares, pois elas atuariam como fenestrações endoteliais permitindo a passagem de plasma e facilitando a remodelação da matriz extracelular. Por sua vez, o extravasamento de plasma e fibrinogênio propiciado pelo *VEGF* associado às mudanças estruturais da matriz extracelular, induz a proliferação de fibroblastos e a migração endotelial (DVORAK et al., 1985; DVORAK et al., 1995a; DVORAK et al., 1995b; MIDDLETON et al., 1997).

2.2.3 *VEGF* e remodelação óssea

Um importante aspecto no complexo processo de formação óssea *in vivo* é a vascularização. No local da formação óssea, osteoblastos e as células osteoprogenitoras, estão localizados adjacentes às células endoteliais dos vasos sanguíneos, sugerindo que a angiogênese e a osteogênese estão mutuamente dependente (DECKER et al., 1995; DECKERS et al., 2000).

Existe uma íntima relação entre os vasos sanguíneos e os osteoblastos na formação óssea, sendo que a invasão vascular é um pré-requisito para a formação óssea e o reparo de fraturas em geral. Fatores produzidos pelas células endoteliais podem afetar a função ou a diferenciação de células ósseas, e os osteoblastos também são capazes de produzirem fatores parácrinos que influenciam as células

endoteliais. Nesta inter-relação entre as células endoteliais e o osteoblasto, o *VEGF* tem uma importante participação e o bloqueio da ação endógena do *VEGF* pode inibir a formação e a reabsorção óssea (STREET et al., 2002; ATHANASOPOULOS et al., 2007). Portanto, durante o desenvolvimento e o reparo ósseo, são necessários que ocorra a coordenação de múltiplos eventos como a migração, diferenciação e ativação de vários tipos celulares e teciduais. Neste caso, o desenvolvimento inicial da microvasculatura é crítico para a homeostasia e regeneração do tecido ósseo, sem os quais, o tecido poderia simplesmente degenerar e morrer (COLNOT et al., 2005).

Historicamente, a importância do grau de vascularização na osteogênese começou inicialmente no ano de 1762, quando Albrecht von Haller sugeriu que os vasos sanguíneos eram responsáveis pela formação óssea. Nesta mesma época, John Hunter (1794) salientou a importância da vascularização durante no desenvolvimento e o reparo do tecido ósseo injuriado. A partir daí o estudo da osteogênese, focou principalmente o grau de formação óssea pelos osteoblastos, sendo o papel dos vasos sanguíneos esquecidos. O interesse na vascularização óssea só foi reavivado em 1963, quando Trueta (1963) propôs que havia um fator de estimulação vascular (*VSF*) presente e ativo no sítio da injúria óssea. Embora o *VEGF* seja um regulador crítico da fisiologia da angiogênese ele também tem uma significativa participação no crescimento e reparo ósseo (GERBER & FERRARA, 2000; ZELZER et al., 2002). O *VEGF* pode estimular as células endoteliais a sintetizar fatores osteogênicos e indiretamente promover a formação óssea. Além disso, os osteoblastos sintetizam e respondem ao *VEGF* em resposta a vários estímulos (STREET et al., 2002; ZELZER et al., 2002; MAYR-WOHLFART et al., 2002; ZELZER et al., 2002). A formação óssea estimulada pelo *VEGF* tanto em *in vitro* como *in vivo*, diretamente afeta os osteoblastos. A inibição do *VEGF* prejudica a diferenciação dos osteoblastos *in vitro* e o crescimento ósseo *in vivo* (ZELZER et al., 2002).

O *VEGF* também tem efeito direto nos osteoclastos sendo necessário para reabsorção óssea normal durante a ossificação endocondral por influenciar no recrutamento, sobrevivência, atividade e diferenciação destas células (GERBER & FERRARA, 2000; ENGSIG et al., 2000; NAKAGAWA et al., 2000; ZELZER et al., 2002;). Para o recrutamento de osteoclastos para as áreas de reabsorção,

precursores de osteoclastos necessitam aderir e migrar através do endotélio em um fino e regulado mecanismo, similar ao processo de transmigração de leucócitos e monócitos (IMHOF & DUNON, 1997). Tem sido proposto que o endotélio pode direcionar os precursores de osteoclastos para áreas específicas do tecido ósseo, ajudando a controlar o processo de reabsorção (PARFITT, 2000; PARFITT, 2001; PARFITT, 2002). Assim, alterações na rede da microvasculatura, poderia afetar a fina regulação dos eventos que envolvem a reabsorção óssea e levar a diminuição da formação óssea, regeneração e reparo, bem como alterar a osseointegração de implantes ortopédicos e dentais (GLOWACKI et al.,1998).

3. Proposição

3. PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo é avaliar *in vivo* a influência da aplicação do laser de baixa potência sobre o processo de remodelação óssea, por meio de análise microscópica e da expressão de genes envolvidos nesse processo, após a expansão rápida da maxila.

3.2 Objetivos específicos

1. Quantificar a expressão das proteínas (*RANK*, *RANK-L*, *OPG* e *VEGF*, no tecido ósseo submetido à força ortopédica, por meio do RT-PCR e Western Blotting.
2. Verificar histologicamente a remodelação óssea do tecido ósseo submetido à força ortopédica e aplicação do laser.
3. Avaliar a influência do laser de baixa potência na remodelação óssea, com o uso de uma aplicação e aplicações múltiplas.

4. Material e Método

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Material

4.1.1 Amostragem (Seleção dos Animais)

Foi usado para este experimento um total de 105 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, *albinus*) machos com seis semanas de vida (jovens em desenvolvimento) pesando em média 180g. Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo – campus Ribeirão Preto. Este projeto teve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA - USP) protocolo 05.1.1276.53.7 (Anexo A). Durante todo o período experimental os animais foram alimentados com dieta padrão, constituída por ração moída (Labina - Purina) a fim de se evitar eventuais danos ao aparelho ortodôntico durante a mastigação; e água *ad libitum*.

4.1.2 Delineamento Experimental

Para cada período experimental foram utilizados cinco animais (n=5), sendo as distribuições aleatórias dos animais, nos Grupos Controle e Experimentais, da seguinte forma:

Grupo Controle Negativo (n=10): animais não tratados, sem expansão rápida da maxila (ERM) e sem aplicação do laser de baixa potência (LBP), sendo 5 animais usados para RT-PCR e Western Blotting e 5 usados para os exames histológicos.

Grupo Experimental I (n=40): animais que tiveram ERM, sendo 25 animais submetidos à eutanásia 1, 2, 3, 7 e 10 dias após ERM (para RT-PCR e Western Blotting) e 15 animais submetidos à eutanásia 0, 7 e 10 dias para exames histológicos.

Grupo Experimental II (n=40): animais que tiveram ERM + LBP (160J/cm²) no primeiro dia, sendo 25 animais submetidos à eutanásia nos períodos 1, 2, 3, 7 e 10 dias após ERM para RT-PCR e Western Blotting, e 15 animais submetidos à eutanásia nos períodos 0, 7 e 10 dias usados para os exames histológicos.

Grupo Experimental III (n=15): animais que tiveram ERM + LBP nos primeiros três dias do experimento (3X160 total = 480J/cm²), sendo 15 animais submetidos à eutanásia nos períodos 3, 5 e 7 dias para os exames de PCR e Western Blotting (quadro 1).

Estes períodos foram selecionados uma vez que os genes relacionados às proteínas em estudo se manifestam nos períodos iniciais da osteoclastogênese.

RATOS JOVENS (6 SEMANAS DE VIDA)			
Controle	Disjunção	Disjunção + laser	Disjunção + laser diário
Dia 0	Dia 0	Dia 0	
	01 dia	01 dia * (160J)	
	02 dias	02 dias * (160J)	
	03 dias	03 dias * (160J)	3 dias ** (480J)
	07 dias	07 dias * (160J)	7 dias ** (480J)
	10 dias	10 dias * (160J)	10 dias ** (480J)

* uma única aplicação de laser no dia da instalação do aparelho, totalizando 160 J/cm².

** três aplicações, sendo uma aplicação a cada dia, nos 3 primeiros dias, totalizando 480 J/cm².

Quadro 1 - Distribuição da amostra de acordo com os períodos e irradiação com laser.

4.2 Método

4.2.1 Anestesia dos Animais

Todos os procedimentos nos animais foram realizados sob sedação com Ketamina (anestésico Ketamina Agener) e Xylazina (relaxante muscular Dopaser) numa proporção 1:2 respectivamente (1mg/kg) por via intramuscular.

4.2.2 Instalação e Ativação do Dispositivo Ortodôntico para a Disjunção da Sutura Palatina Mediana

O mecanismo de força utilizado era constituído de um grampo passivo de 1,5 mm de largura, confeccionada com fio de aço inoxidável de 0,5mm de diâmetro (Morelli[®], Sorocaba, Brasil), colocada entre os incisivos superiores (Figura 2), semelhante ao apresentado na literatura (SAITO & SHIMIZU, 1997; SAWADA & SHIMIZU, 1996) com o intuito de possibilitar a correta calibração e padronização da força empregada em todos os animais e permitir manter a disjunção da sutura palatina mediana. Todos os ratos dos Grupos Experimentais foram submetidos à disjunção da sutura palatina.

Na montagem do dispositivo para disjunção foram utilizados alicates n^o 139, alicate para corte de fio espesso (Dentaurum[®]), espelho bucal (Duflex[®]), sonda exploradora n^o 5 (Duflex[®]) e calcador de anéis (Duflex[®]). Todos os dispositivos ortodônticos foram confeccionados e instalados pelo mesmo operador e assistente, seguindo sempre o mesmo protocolo.

Previamente a montagem do dispositivo para a disjunção maxilar foi preparada a superfície dos incisivos para aumentar a retenção e estabilizar a mola a ser confeccionada para inseri-la entre os incisivos superiores. Foi utilizada uma broca

esférica diamantada nº1011 (K.G. Sorensen) em motor de alta rotação (Dabi-Atlante) para confeccionar sulcos rasos, apenas no esmalte, no terço gengival das faces vestibular e distal dos incisivos superiores. Em seguida foi realizada profilaxia dos incisivos com pasta de pedra-pomes misturada com água aplicada em taça de borracha (Viking[®]) em contra-ângulo adaptado ao micromotor (Dabi-Atlante[®]) por 15 segundos. Realizou-se a lavagem com spray (água-ar) e a secagem com ar proveniente da seringa tríplice e condicionamento do esmalte nos incisivos utilizando ácido ortofosfórico a 37% em forma de gel (3M[®]), durante 60 segundos, conforme recomendações do fabricante. Na sequência foi feita, novamente, a lavagem e secagem das superfícies dentárias, por 15 segundos, com o auxílio da seringa tríplice. O agente de união (Primer e Bond 2.0 - Dentsply[®]) foi aplicado sobre a superfície condicionada do esmalte e fotopolimerizado com luz halógena por 20 segundos com auxílio do aparelho Heliomat II (Vigodent[®]). A resina fotopolimerizável (Transbond-ETM[®]) foi adaptada sobre o segmento de fio nas faces vestibular e distal recobrando-o e, em seguida foi induzida a polimerização por meio de luz halógena, com comprimento de onda de 470nm (Heliomat II, Vigodent[®]), durante 30 segundos, dirigida em orientação oclusal, vestibular, mesial e distal de cada incisivo. Para compensar o desgaste decorrente do contínuo hábito roedor dos animais, várias camadas de resina foram fotopolimerizadas sobre o grampo. Após a ativação inicial, o aparelho não recebeu outra ativação adicional durante o experimento e seu correto posicionamento foi conferido diariamente, quanto à posição, à estabilidade e à necessidade de correções na eventualidade de estar causando injúrias à mucosa oral do animal.

A espessura da mola de aço inoxidável foi determinada com base em resultados de um estudo preliminar (SAWADA & SHIMIZU, 1996) que indicou que 1,5mm de disjunção entre os incisivos induz a taxa máxima de separação na sutura palatina mediana sem diminuição contínua do peso corpóreo do animal. Todos os procedimentos operatórios foram realizados na sala de Cirurgia Experimental do Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP, em condições de higiene adequadas e, pelos mesmos operadores.

4.2.3 Procedimento de Irradiação com Laser

Como fonte de laser de baixa-potência, um dispositivo de laser de diodo de alumínio-gálio-arsenieto (Al-Ga-As) (DMC® – São Carlos – SP) foi usado. As especificações técnicas deste dispositivo de laser são como segue: variáveis - comprimento de onda: 830nm (invisível e estando na faixa do infravermelho próximo); aplicação pontual; 100mW de potência e a densidade de energia utilizada foram de 160J/cm² baseada em experimentos anteriores (TAKEDA, 1988; ORIKASA, SHIMAKURA & KUSAKARI, 1989; NAGASAWA, KATO & NEGISHI, 1991). No caso do feixe de laser, a grandeza é a energia luminosa (medida em Joules) e a área é aquela abrangida pelo ângulo sólido formado pelo feixe sobre a superfície de aplicação (medida em cm²), que nesse aparelho de aplicação pontual, é fixa (0,00785 mm²). Essa dosagem (J/cm²) foi aplicada calculando-se o tempo (s) necessário numa determinada potência (mW) de 100mW, onde: $D=P \times T/A$.

Parâmetros de irradiação	Valores
Densidade de Energia (DE)	160J/cm ²
Potência	100mW
Comprimento de onda	830nm
Côr	Invisível (IV)
Regime de emissão	Contínuo
Área de abrangência	0,00785mm ²
Distância da mucosa	Em contato/método pontual
Tempo	42 segundos/ponto único de aplicação

Quadro 2 - Protocolo de irradiação utilizado.

A ponta do laser é composta por uma fibra óptica 0,6mm de diâmetro cuja área de irradiação corresponde a 0,00785mm², e a irradiação foi aplicada sob anestesia, colocando a extremidade da ponta da fibra óptica em contato com a mucosa palatal na linha média e o ponto mediano entre as extremidades anteriores dos incisivos e papila incisiva (Figura 2).

Figura 2 - Vista oclusal durante irradiação de laser na sutura palatina mediana, com o dispositivo ortodôntico entre os incisivos centrais.

4.2.4 Eutanásia dos Animais, coleta e preparo dos espécimes

Os procedimentos operatórios foram realizados na sala de cirurgia experimental do Biotério I da FORP-USP, em condições de limpeza, anti-sepsia e desinfecção, com instrumentos esterilizados em autoclave. Ao término dos períodos experimentais, os animais sofreram eutanásia por uma injeção com sobredose de anestésico com Ketamina e Xilazina via intramuscular e, em seguida, foram decapitados.

A metodologia deste trabalho foi desenvolvida em três etapas: Análise Histológica, RT-PCR em tempo real e Western Blotting. As peças foram cuidadosamente coletadas e subdivididas conforme o tipo de análise a ser realizada posteriormente.

Parte da amostra que seria destinada a exames histológicos foi conservada em paraformaldeído tamponado a 10% e a outra metade, destinada ao RT-PCR e Western Blotting, foi dissecada logo após a eutanásia e imediatamente conservada no freezer à -80°C.

1) Nos grupos para análise histológica, a maxila de cada animal foi removida, dissecada, seccionada mantendo a sutura palatina mediana. Fixou-se em solução de paraformaldeído tamponado a 10%, com tampão fosfato (pH 7,2 - 7,4) por 48 horas. Os cortes histológicos para a realização da análise microscópica foram obtidos com 5µm de espessura, em micrótomo rotatório, de acordo com a rotina do Laboratório de Morfologia da FORP - USP.

2) Imediatamente após a eutanásia dos animais, nos grupos para extração de RNA, o tecido ósseo ao redor da sutura palatina mediana foi removido, dissecado e armazenado em tubos “eppendorf” contendo RNAlater® (Ambion Inc., Austin, TX, USA) para a preservação da integridade do RNA, permitindo assim o transporte posterior e acondicionamento das amostras em freezer -80°C, até o momento da extração de RNA total, para a realização do RT-PCR em tempo real e Western blotting que será descrito posteriormente.

Cinco animais por período foram aleatoriamente utilizados para obtenção dos espécimes para cada uma das técnicas estudadas. Portanto, parte da amostra foi destinada ao RT-PCR em tempo real e Western blotting e a outra parte para a microscopia óptica corados com hematoxilina-eosina (HE) e Tricromico de Masson.

4.2.5 Metodologias para Avaliar a Formação Óssea e a Expressão Gênica do *RANK*, *RANK-L* e *OPG* após a ERM

4.2.5.1 Processamento Histológico

Após a eutanásia as peças foram mantidas em solução de Paraformaldeído (PFA 10%) a 4° C por 48 horas para completar a fixação. Após este período as peças foram lavadas em solução tampão de Fosfato 0,1M e salina a 0,9% (PBS) por 30 minutos. Em seguida, foram colocadas em solução desmineralizadora de etileno-diamino-tetracetato-dissódico a 10%, 0.25M e pH=7,0 (EDTA - Labormax Produtos Químicos e Indústria), sob agitação constante à temperatura de 2 a 8°C. A solução foi trocada a cada dois dias até a amostra ser completamente descalcificada. Ao final desse período, o osso já descalcificado foi desidratado em concentrações

crescentes de álcool (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), diafanizado em xilol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e incluído em parafina de baixa fusão (Dinâmica Química Contemporânea, Brasil). Secções longitudinais semisseriadas com 5µm de espessura foram obtidas no sentido coronal (ântero-posterior) e longitudinal (infero-superior) e montadas em lâminas silanizadas (Dako Cytomation North America Inc, Carpinteria, CA, EUA). As lâminas destinadas à análise histológica foram coradas com Tricrômio de Masson e Hematoxilina e Eosina (H/E). O corte mais central de cada peça foi selecionado e serviu também como guia para a escolha dos outros cortes, assim, dois cortes diretamente antes e dois cortes diretamente depois foram selecionados para a análise histométrica dos parâmetros pré-definidos usando um programa de análise de imagens programa DP2-BSW® (Olympus). A montagem das lâminas se fez com lamínulas de vidro em “permount” (Fischer, USA), para o exame microscópico de rotina. Após secagem, as lâminas com os respectivos cortes corados, foram acondicionadas em caixas apropriadas e armazenadas em ambiente seco e fresco. Os parâmetros distância entre os incisivos (terço médiol) e largura da sutura (nível nasal, médio e cervical) foram histometricamente analisados ao 0, 7 e 10 dias.

O objetivo da análise histológica foi investigar os eventos morfológicos que ocorreram na interface entre sutura palatina mediana e borda óssea, focando na presença de remodelação óssea. A vitalidade do tecido sutural foi observada por meio da análise microscópica com auxílio do microscópio de transmissão de luz e considerou-se como critério de avaliação qualitativa a observação de tecido conjuntivo com presença de camada de osteoblastos delimitando as bordas ósseas, com vasos sanguíneos, fibroblastos e outros tipos celulares na porção central desse tecido, áreas de fibras colágenas, presença ou não de processo inflamatório, formação e organização do tecido conjuntivo, ósseo e medular, e remodelação óssea.

Os critérios morfológicos adotados para identificação dos tipos celulares avaliados foram os seguintes:

Osteoblastos: células dispostas na superfície óssea, lado a lado, num arranjo que lembra o epitélio simples. Em intensa atividade sintética mostram-se

cubóides e com citoplasma muito basófilo e em estado pouco ativo são achatados e apresentam fraca basofilia citoplasmática.

Osteócitos: células presentes nas lacunas da matriz óssea.

Osteoclastos: células multinucleadas responsáveis pela reabsorção da matriz óssea mineralizada e desmineralizada.

4.2.5.2 Determinação da distância entre os incisivos e largura da sutura palatina mediana

A medida da distância entre os incisivos foi realizada no terço médio da coroa dentária e a largura da sutura palatina mediana foi realizada em 3 níveis: cervical (borda inferior da sutura palatina mediana), médio (distância média entre o nível cervical e nasal) e nasal (tomando como referência o assoalho da fossa nasal) utilizando o programa de análise através do programa DP2-BSW[®] (Olympus). Todos os dados foram obtidos aleatoriamente cinco vezes e realizados em cortes frontais (Figuras 3 e 4).

Figura 3 - Fotos histológicas mostrando a medida da distância entre os incisivos (seta) no Grupo Controle **(A)** e imediatamente pós expansão **(B)**.

Figura 4 - Fotos histológicas mostrando as medidas da distância entre as bordas da sutura palatina mediana no terço cervical **(a)**, médio **(b)** e nasal **(c)** e imediatamente pós expansão **(dia 0)**.

4.2.5.3 Análise da Expressão Gênica

A técnica de RT-PCR combina a síntese de cDNA, a partir de moldes de RNA, com PCR para fornecer um método rápido e específico para análise da expressão gênica. O RT-PCR em tempo real é usado para detectar e semiquantificar a expressão da mensagem, de pequenas quantidades de RNA (BUSTIN, 2000). No presente estudo, o controle positivo, tanto para *RANK*, *RANK-L*, *OPG* e *VEGF*, foi realizado com o gene constitutivo, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*).

4.2.5.3.1 Extração, Isolamento e Avaliação do RNA total

A solução de RNAlater foi aspirada e as peças ósseas ainda congeladas foram adicionadas em solução de lise. O RNA foi extraído da maxila dos animais (50-100mg) usando o Sistema de extração de RNA total SV (Promega, Madison, WI), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Para isso as amostras de tecido ósseo foram inicialmente maceradas, pulverizadas em grau com pistilo contendo nitrogênio líquido. A seguir os tecidos foram imersos em reagente Trizol (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad/CA, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, na proporção de 1mL de Trizol para cada 1mg de tecido, sendo agitado por 30 segundos e mantidos a temperatura ambiente por 5 minutos. As amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos (vortex), seguidas da adição de 0,2mL de clorofórmio para cada mL de suspensão e centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos, à 4°C, com formação de duas fases. A fase aquosa (superior) foi transferida para um tubo novo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, sofrendo agitação em vortex e incubado por 20 minutos a 4°C para precipitar o RNA da fase aquosa. Para permitir a secagem das amostras, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados abertos em temperatura ambiente por 5 minutos dentro de uma capela de fluxo laminar vertical para impedir a contaminação das amostras. As amostras de RNA foram resuspensas em 50µL de água deionizada estéril tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e livre de RNase, incubadas por 10 minutos a 56°C, e armazenado no freezer a -80°C para posterior análise.

Posteriormente, a quantidade e a pureza do RNA foram determinadas por espectrofotômetro Nanodrop (ND 100, Nanodrop Technologies, USA) nos comprimentos de onda de 260nm e da relação entre absorbâncias a A260/A280nm, respectivamente. A relação A260/A280 foi considerada aceitável se estivesse entre 1.8 e 2.0, pois valores nesse intervalo indicam ausência de DNA na amostra (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

4.2.5.3.2 Análise da Expressão do mRNA pela PCR em Tempo Real

Os produtos da transcrição reversa RT-PCR serviram de molde para a amplificação e as reações de PCR foram analisados em tempo real, utilizando o kit TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, California) para os seguintes genes alvos: *RANK* (Rn 01426423-m1 134bp); *RANK-L* (Rn 00589289-m1 69pb); *OPG* (Rn 00563499-m1 75pb; e *VEGF* (Rn 01511604-m1 101pb). O controle endógeno TaqMan (Applied Biosystems) para o gene GAPDH (X02231 437bp) (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi usado como gene de referência para a normalização dos valores (BUSTIN, 2000; SAMBROOK & RUSSEL, 2001) .

Primeiramente, o RNA total foi tratado para a eliminação de qualquer resíduo de DNA na amostra (DNA-free™, Ambkm Inc., Austin, TX, USA) e posteriormente utilizado para a síntese de cDNA, onde 1µg da amostra (RNA) foi utilizado para a síntese do DNA complementar. A síntese do cDNA foi obtida a partir do RNA total, por reação de transcrição reversa, com a utilização 1µL de transcriptase reversa (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied BioSystems) em presença de 1µL de inibidor de RNase (Applied BioSystems). A ordem e etapas de incubação foram realizadas de acordo com as recomendações de tempo e temperatura do fabricante dos reagentes, onde cDNA foi sintetizado utilizando o Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Milan, Italy) a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. Os cDNAs obtidos foram armazenados a -20°C até a realização do RT-PCR.

O perfil das reações foi determinado seguindo as recomendações do fabricante do equipamento. As amplificações por PCR foram realizadas em quadruplicatas utilizando 50ng de cDNA por reação, e a água deionizada foi usada como controle negativo. As reações foram preparadas com reagentes padronizados para PCR em tempo real (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystem) adicionado dos conjuntos de primers e sonda específico para cada primer.

As condições de ciclagem térmica consistiu de um ciclo inicial a 50°C (2 minutos), desnaturação a 95°C (10 minutos) e 40 repetições (ciclos de amplificação) a 95°C (15 segundos) e a 60°C (1 minuto), seguido de curva de dissociação padrão

no sistema de detecção CFX 96 Real-time PCR (Bio-rad, California, EUA). Cada ciclo consistiu das fases de desnaturação, anelamento e extensão, sendo o tempo e temperatura de cada fase padronizada, de acordo com os primers utilizados. Para cada par de primers foi realizada PCR em água esterilizada para avaliação de possível contaminação dos primers (controle negativo água).

Para análise do RNAm, a expressão relativa do gene foi calculada em referência a expressão do *GAPDH* usando o método C_T (Threshold Cycle - $2^{-\Delta\Delta C_T}$). O método C_T que se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção. Os resultados individuais expressos em valores de C_T foram a seguir transferidos para planilhas e agrupados de acordo com o grupo animal (laser e não-laser) e período experimental, para a realização da análise estatística.

4.2.5.4 Expressão das Proteínas

4.2.5.4.1 Western Blotting

O Western Blotting é um método altamente específico para detectar proteínas em um homogenato de células trituradas ou extraído de tecido biológico. Essa técnica usa eletroforese em gel para separar, após desnaturação, proteínas com pesos moleculares diferentes. As proteínas são transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose, sobre a qual será usado como sonda, anticorpo primário específico, contra a proteína de interesse e anticorpo secundário biotinilado associado peroxidase. A detecção do sinal é obtida com adição de um substrato quimioluminescente para esta peroxidase, sendo realizada revelação radiográfica para visualização das bandas. Nos resultados encontrados neste estudo foi avaliada a expressão de *RANK*, *RANK-L*, *OPG* e *VEGF* nas amostras, que foi comparada entre grupos e períodos. Para a análise quantitativa dessas proteínas por *western blotting* foram utilizadas amostras coletadas de 5 animais por grupo e período, congeladas a -80°C .

4.2.5.4.1.1 Extração e quantificação de proteína total

Para extração da proteína total, o tecido ósseo de cada grupo animal, foi macerado em um graal e pistilo de porcelana autoclavado. Posteriormente foram coletadas em 1 ml de PBS e centrifugadas a 10.000g, durante 10 minutos a 4°C, para obtenção do *pellet*. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resuspenso em 100 µl de solução tampão Ripa (Ripa buffer; Pierce Biotechnology, Rockford, EUA), contendo inibidores de proteases (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha) e inibidores de fosfatases (PhosphoStop, Roche Applied Science). Os tubos foram mantidos em gelo por 20 minutos, centrifugados a 10.000g durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Posteriormente para a quantificação da proteína total dos extratos protéicos, a partir do material removido da sutura palatina mediana foi realizado por meio do método de Bradford (Bradford, 1976). Para isto, foram utilizados 750µl do reagente de Bradford (BioRad) em 747,5µl água deionizada (1500µl), descontando-se 2,5µl para a amostra protéica, e uma solução de branco (de solução de Bradford, água deionizada e tampão de lise), em luz visível de comprimento de onda de 595nm foi usada para calibrar o espectrofotômetro (Spectronic). Os valores da absorbância das amostras foram aplicados ao gráfico da curva de Bradford, feito em planilha eletrônica (Excel) a partir das leituras da solução padrão de albumina sérica bovina (BSA - Sigma) nas concentrações de 1,0 a 10µg/µl, realizadas no mesmo procedimento. A leitura foi realizada em triplicata.

4.2.5.4.1.2 Preparo das amostras

Cinquenta µg de proteína total foram adicionados ao tampão de carregamento* contendo β-Mercaptoetanol, na proporção de 1:4 e submetidos à desnaturação a 95°C por 5 minutos. Foram utilizados para realização do tampão os seguintes componentes, 20% Glicerol: densidade; 10% de BME (beta-mercaptoetanol) para efetuar quebra das pontes de dissulfeto desfazendo a estrutura quaternária, com isto, expondo os epítomos aonde o anticorpo irá se ligar; mais 4% SDS (Dodecil

Sulfato de Sódio, Bio-Rad Laboratories, Califórnia - USA) deixando as proteínas da amostra carregadas negativamente para que possam correr mais facilmente no gel; e por fim 0,004% Azul de Bromofenol, um corante, que facilita a visualização da corrida.

4.2.5.4.1.3 Corrida das proteínas no gel de poliacrilamida e transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose

a) Foram utilizados 50 µg de proteína total de cada amostra e as mesmas foram eletroforéticamente separadas por tamanho, usando-se sistema de gel de poliacrilamida de 10 a 15%, dependendo do peso molecular da proteína de interesse, pelo sistema SDS-PAGE. O marcador do peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope (Bio-Rad Kaleidoscope Prestained Standards cod. 161-0324 - Control 310001228, Bio-Rad Laboratories, Califomia - USA) aplicado no respectivo gel.

b) A corrida foi iniciada com 200 Volts (constante) até passar o gel de largada. Em seguida, foi mantida a amperagem (constante) de 150V até o final da corrida (aproximadamente 1:30 horas).

c) Após a separação das proteínas de acordo com o peso molecular, as mesmas foram eletroforéticamente transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando solução-tampão de transferência em um aparato de transferência úmida. Para isso utilizou-se o kit para transferência imerso no tampão de transferência[#] onde foi feito um "sanduíche" contendo: esponja + papel de filtro + gel + membrana de nitrocelulose + papel de filtro + esponja. Em seguida, foi transferido para cuba e coberto com o tampão de transferência[#] (6,05g de Tris; 2,82g de Glicina; 400 mL de Metanol e 0,4g de SDS, completando com água deionizada até 2L). A transferência foi realizada em 100 volts com amperagem constante por 1 hora.

4.2.5.4.1.4 Imunomarcacão e a evidenciación das proteínas na membrana de nitrocelulose

Para a imunomarcacão e a evidenciación das proteínas na membrana de nitrocelulose foram realizados os seguintes procedimentos:

a) Após a transferência, das proteínas para as membranas de nitrocelulose, a membrana foi colocada em solução de Ponceau Red para verificar o aparecimento das bandas e se a transferência ocorreu satisfatoriamente.

b) Em seguida os sítios de ligação não-específica foram bloqueados. Para isso a membrana foi incubada em solução salina tamponada com Tris (TBS; StartingBlock™ TBS Blocking Buffer; Pierce Biotechnology, Rockford, EUA) contendo albumina de soro bovino a 5%, por 1 hora, sob constante agitação, em temperatura ambiente.

c) Posteriormente, a solução de bloqueio foi removida lavando a membrana com solução basal (TBST) por 5 minutos (3x), para a retirada do excesso de albumina e as mesmas foram incubadas no anticorpo primário específico (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A) para RANK (SC-7626), *RANK-L* (SC-7628), *OPG* (SC-8468) e *VEGF* (SC-7269), GAPDH (SC-25778) diluídas no diluente para anticorpo em 10 mL de solução Basal + 0,3g BSA (albumina) na concentração de 1:200, sob agitação constante, *overnight*, em temperatura de 4°C. Os anticorpos foram previamente titulados com o objetivo de determinar as concentrações e tempo de incubação adequado, para cada um.

d) No dia seguinte, as membranas foram lavadas na solução basal (TBST) por 5 minutos (3x), para a retirada do excesso de anticorpo primário e a seguir foram incubadas com anticorpos secundários contra imunoglobulina G (IgG) de cabra, camundongo ou coelho conjugados à *horseradish* peroxidase (Santa Cruz Biotechnology), por 30 minutos, sob agitação, à temperatura ambiente, diluídos em 1:10.000 no diluente para anticorpo.

e) A seguir, as membranas foram lavadas em TBST por 5 minutos (4x). As

bandas foram evidenciadas por quimioluminescência utilizando o sistema de detecção West-Pico Enhanced Chemoluminescence (ECL; Pierce Biotechnology), por 5 minutos, seguido pela exposição em filmes radiográficos. As bandas géis foram fotografadas com uma câmara digital (Sony) sobre negatoscópio (VH Equipamentos, Araraquara, Brasil).

Portanto, para análise quantitativa por densitometria foi usado como parâmetro de comparação os valores de intensidade obtidos para banda GAPDH. As imagens obtidas das bandas das proteínas *OPG*, *RANK*, *RANK-L* e *VEGF* de todos os grupos estudados foram comparadas através da análise densitométrica (em função dos pixels e da área da banda). Para isso todas as imagens da chapa fotográfica foram capturadas com 300dpi de resolução usando máquina fotográfica digital (Sony) e transferidas para o software IMAGE J 1.28u (programa de domínio público desenvolvido por Wayne Rasband NIMH, NIH, USA), onde foram feitas as quantificações por densitometria. Para cada amostra foi obtida uma relação entre a intensidade da banda alvo (*RANK*, *RANK-L*, *OPG* e *VEGF*) e a banda de *GAPDH* no gel de agarose. Os dados obtidos foram submetidos à normalização e os resultados foram apresentados em forma de porcentagem (expressão relativa), mostrando o valor que cada banda ocupa em relação à área selecionada.

4.2.6 Análise dos Resultados

4.2.6.1 Precisão da Metodologia (Calibração do examinador)

Para a confiabilidade dos resultados desse trabalho, procurou-se minimizar os erros dos métodos de mensuração empregados. Calculou-se a precisão do investigador pelo erro sistemático intraexaminador. O erro sistemático reflete uma falta de padronização do método, uma vez que o examinador tende a sub ou superestimar os valores de suas medições de maneira inconsciente, de modo a direcionar os resultados de acordo com as expectativas em relação às conclusões do estudo. Para avaliar a calibração do examinador, nas medidas histológicas, foi

realizada, previamente às leituras finais, a correlação intraclasse. Vinte cortes foram aleatoriamente selecionados e suas medições foram feitas e repetidas três semanas após a primeira medição. Assim, observou-se que erros na verificação da precisão desse estudo foram admissíveis, promovendo resultados fidedignos.

Para estimar o valor do erro intraexaminador sistemático do método, as amostras de RT-PCR e Western blotting foram novamente analisadas, 30 dias após a análise inicial. O teste *t* pareado foi usado para analisar o erro intraexaminador sistemático do método, por meio da comparação dos valores das duas análises distintas com intervalo de 30 dias. Valores de $p > 0,05$ foram considerados para estimar a viabilidade de utilização do método proposto. Assim, observou-se que erros na verificação da precisão desse estudo foram admissíveis, promovendo resultados fidedignos.

4.2.7 Análise Estatística

Os resultados do RT-PCR em tempo real para cada gen, os valores da densidade óptica relativa das bandas imunorreativas e as medidas histológicas foram agrupados de acordo com o grupo animal (laser e não-laser) e período experimental, foram organizados em tabelas e submetidos à análise estatística.

Uma vez obtidos os dados, médias representativas de cada grupo foram submetidas a uma análise estatística com nível de significância de 5%. Para a análise intragrupo (efeito do tempo) foi utilizado o teste paramétrico de análise de variância (One-Way ANOVA) e, quando detectada diferença estatisticamente significativa, o teste paramétrico de Tukey foi utilizado para detectar a diferença entre os grupos dentro do mesmo ensaio.

A análise intergrupo (efeito do tratamento) testou a hipótese de que a aplicação do laser de baixa potência modifica a reparação óssea por meio da alteração do padrão de expressão gênica por meio do teste paramétrico de análise de variância (Two-Way ANOVA) e, quando detectada diferença estatisticamente significativa, o teste paramétrico de Tukey ($p < 0,05$) foi aplicado. Todos os testes

foram realizados com o programa de estatística GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA), tendo sido adotado o nível de significância de 0,05 ($\alpha=5\%$) para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas.

5. Resultado.

5. RESULTADO

5.1 Análise Histológica

5.1.1 Mudança no espaço entre os incisivos

Esta análise foi feita para detectar o grau de separação entre os incisivos apoiados pelo aparelho de disjunção maxilar durante o período experimental. O teste ANOVA, seguido do teste de Tukey, relacionou os valores médios entre os grupos experimentais (I e II) e grupo controle (GC).

A medida da separação dos incisivos após a ERM foi realizada no terço médio da coroa dos incisivos e a separação máxima foi obtida logo após este procedimento ortodôntico (dia 0). O local da obtenção da medida é mostrado na figura 3, página 58 e os dados estatísticos nas figuras 5 e 6.

As medidas do espaço entre os incisivos nos cortes histológicos mostraram que eles foram separados após a aplicação da força. Este espaço foi mantido durante toda a fase experimental e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada em todos os grupos quando comparamos com o grupo expansão imediata (dia 0), porém houve diferença quando comparamos todos os grupos com o grupo controle (Figura 5).

Figura 5 - Medida da distância do espaço entre os incisivos no terço médio da coroa destes dentes nos Grupos Controle, Experimental I e II. Os dados correspondem a 0, 7 e 14 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$.

Observou-se na análise intragrupos, que a distância entre os incisivos tanto no grupo Experimental I quanto no II não apresentaram diferenças estatísticas significativas, porém mostraram um aumento significativo (** $p < 0,001$) quando comparado com o controle.

Figura 6 - Medida do espaço no terço médio da coroa dos incisivos dos Grupos Experimentais I e II. Os dados correspondem a 0, 7 e 14 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns = não significativo.

Observou-se na análise intergrupos, que não houve diferença significativa entre o grupo Experimental I e o II.

5.1.2 Mudança na largura da sutura (abertura da sutura)

Esta análise foi feita para detectar o grau de separação entre as bordas da sutura palatina mediana durante o período experimental. A largura da abertura da sutura foi medida em três níveis: terço cervical (borda inferior da sutura); terço nasal (tendo como referência o assoalho da fossa nasal) e terço médio (média da distância entre o terço cervical e nasal) mostrado na figura 4 e os dados estatísticos nas figuras 7 à 12.

a) TERÇO NASAL

Figura 7 - Medida da largura da sutura no terço nasal dos grupos Exp I e II. Os dados correspondem a 0, 7 e 14 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$; ns = não significativo.

Figura 8 - Medida da largura da sutura no terço nasal dos grupos Exp I e II. Os dados correspondem a 0, 7 e 14 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$; ns = não significativo.

Quando comparamos cada grupo experimental com o grupo controle observou-se, na análise intragrupo, que ambos (Experimental I e II) apresentaram um aumento significativo da distância entre as bordas da sutura, demonstrando que houve a separação ortopédica da sutura palatina mediana. A partir do 7º dia houve um declínio acentuado e significativo ($p < 0,001$) na largura da abertura da sutura palatina em ambos os grupos, mas mesmo assim a largura da sutura permaneceu maior que o grupo controle, com exceção do 14º dia no grupo Experimental II, que não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado com o controle.

A análise intergrupo revelou diferença estatisticamente significativa nos períodos de 7 e 14 dias ($p < 0,001$), observando uma diminuição acentuada na distância entre as bordas da sutura na região do terço nasal no grupo Experimental II ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo Experimental I.

b) TERÇO MÉDIO

Figura 9 - Medida da largura da sutura no terço médio dos grupos Exp I e II. Os dados correspondem a 0, 7 e 14 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$; ns = não significativo.

Figura 10 - Medida da largura da sutura no terço médio dos grupos Exp I e II. Os dados correspondem a 0, 7 e 14 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$; ns = não significativo.

A medida da largura da sutura palatina mediana no terço médio no grupo Exp I mostrou-se um aumento durante os períodos 0, 7 e 14 dias ($p < 0,001$) quando comparado com grupo controle. No grupo Exp II, a largura da abertura da sutura palatina também apresentou aumentada ($p < 0,001$), com exceção do período de 14 dias após aplicação do laser que não mostrou diferença estatisticamente significativa quando comparada com o controle.

A análise intergrupo revelou que após a ERM imediata não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos, porém nos períodos experimentais seguintes, apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,001$) da largura da abertura da sutura no grupo Exp II quando comparada com o grupo Exp I.

c) TERÇO CERVICAL

O terço cervical no grupo Exp I mostrou-se um aumento na largura da abertura da sutura palatina durante os períodos 0, 7 e 14 dias ($p<0,001$) quando comparado com grupo controle. No grupo Exp II, a largura da abertura da sutura palatina também apresentou aumentada significativamente ($p<0,001$) em todos os períodos.

A análise intergrupo mostrou-se semelhante ao terço médio. Após a ERM imediata não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, porém nos períodos experimentais seguintes observou-se uma diminuição significativa da largura da abertura da sutura no grupo Exp II ($p<0,001$) quando comparada com o grupo Exp I.

5.1.3 Análise histológica descritiva

Os resultados morfológicos dos cortes da sutura palatina mediana submetida à ERM e aplicação do LBP estão representados pelas figura 13, página 78 à figura 20 página 91.

a. Grupo controle (sutura normal)

O exame histológico das estruturas da sutura palatina mediana dos animais do **Grupo Controle** mostrou características de normalidade dessas estruturas que serviram como termo comparativo com os animais dos **Grupos Experimentais**.

A superfície óssea sutural apresentou-se ligeiramente ondulada e lisa em seu contorno e estava bem regular e organizada. Ao longo dessa superfície verificou-se osteoblasto em repouso (células achatadas e com núcleos paralelos à superfície óssea e pouco evidente). Foram notados também alguns osteoblastos ativos (células grandes, arredondadas contendo núcleos cubóides e volumosos e de coloração mais clara) enfileirados geralmente de maneira organizada. O tecido conjuntivo sutural caracterizou-se por ser fibroso rico em fibroblastos e fibras colágenas e com a presença de capilares em toda extensão do tecido sutural. Os fibroblastos caracterizaram-se por possuírem núcleo ovóide e claro, e nucléolo evidente. Os feixes de fibras colágenas eram espessos e perpendiculares ou oblíquos à superfície da sutura, inseridos no osso, e fibras com variadas orientações na porção mediana da sutura. Os vasos sangüíneos, normalmente, seguiam a orientação dos feixes de fibras e apresentaram-se com luz circular ou levemente ovaladas e repletos de células sangüíneas. O osso da pré-maxila revelou cavidades medulares e canais de Havers na metade lateral, sendo que na porção medial as trabéculas estavam paralelas à linha mediana separada por linhas de aposição óssea. Foi notada, também, a presença de numerosos osteócitos, no interior das lacunas (Figura 13).

Figura 13 - Região da sutura palatina mediana do grupo controle (corte frontal). **A)** visão panorâmica mostrando a sutura palatina mediana da porção cervical (seta vazada) até a região nasal (seta cheia). O tecido conjuntivo sutural (**TC**) está envolto por tecido ósseo (**O**) e delimitado pelas fossas nasais (**FN**) e pelas coroas dos incisivos superiores (**IS**). **B)** Detalhe da sutura onde é possível verificar osteoblastos (**OB**) delimitando a superfície óssea (**setas brancas**) e vasos sanguíneos (**V**) por toda extensão do tecido sutural. **C)** Presença de fibras colágenas (**FC**) inseridas no tecido ósseo e vários vasos sanguíneos (**V**).

b. Grupo Experimental I (disjunção sem aplicação do laser)

As estruturas da sutura palatina mediana revelaram modificações expressivas de seus componentes, em decorrência da força aplicada.

b.1 Disjunção Imediata (tempo 0)

Após a ERM foi observado um afastamento das margens ósseas suturais das hemi-maxilas, e observou-se que houve rompimento do tecido sutural, e alguns fragmentos ficaram aderidos à margem sutural e outros, destacaram-se desta e foram circundados por neutrófilos. Notou-se ainda, muitas áreas “arroxeadas” devido à autólise das células, com os núcleos picnóticos. A presença de áreas hemorrágicas contendo neutrófilos, linfócitos, hemácias e monócitos foram predominantes neste período, em toda a extensão do tecido sutural. Esta hemorragia vinha das cavidades medulares adjacentes a sutura. O aspecto do tecido sanguíneo estava muito alterado com a presença de rede de fibrinas. As células do tecido sutural, como os fibroblastos e osteoblastos mostravam-se alteradas com núcleo picnótico (contraídos e achatados). O fenômeno de lise celular também foi observado. Houve diminuição do número de células, perda de organização dos feixes de fibras colágenas e poucos vasos sanguíneos íntegros estavam presentes. Nesse período, apesar de não ser tão evidente, houve início da migração de células mononucleares (linfócitos e macrófagos), principalmente na borda lateral da parede óssea, onde ainda apresentava tecido conjuntivo aderido (Figura 14).

Figura 14 - Região da sutura palatina mediana do grupo Experimental I tempo 0, (corte frontal). **A)** visão panorâmica mostrando a sutura palatina mediana onde observa intensa hemorragia (*). Em **B)** observa-se as fibras colágenas (**FC**) aderidas a parede óssea. **C)** Presença de fibras colágenas (**FC**) inseridas no tecido ósseo e alguns vasos sanguíneos (**V**).

b. 2 Disjunção 7 dias

Notou-se, no tecido sutural, grande proliferação vascular, com a presença de neutrófilos (polimorfonucleares) e grande número de mononucleares caracterizando ainda a presença de um infiltrado inflamatório, e, alguns fibroblastos íntegros, fibras colágenas desorganizadas e presença de estruturas fibrilares (fibras elásticas). A presença de macrófagos também foi evidente (células de núcleo grande e claro; citoplasma grande e avermelhado). Algumas regiões revelam a presença de fibroblastos, inclusive, fibras colágenas em desenvolvimento. Quanto aos vasos sangüíneos estes eram numerosos sem a presença de tecido hialinizado, provavelmente, porque já foi fagocitado. Os ossos de sustentação do tecido sutural caracterizaram-se, nos dois terços superiores, por trabécula óssea remanescente delgada circundada por células inflamatórias. A superfície sutural do osso, continha células ativas onde foi observada reabsorção óssea frontal (osteoclastos na superfície óssea), e no lado oposto, em direção às cavidades medulares havia a presença de numerosos osteoclastos ativos, no interior das lacunas de Howship dentro das cavidades medulares, caracterizando uma intensa reabsorção óssea solapante. Em algumas regiões foram observadas algumas trabéculas de osso neoformado desenvolvendo para o lado sutural, porém a remodelação óssea com predomínio de reabsorção era mais intensa (Figura 15).

Figura 15 - Região da sutura palatina mediana do grupo Experimental I (7º dia). **A)** visão panorâmica mostrando a sutura palatina mediana onde ainda observa área hemorrágica (*). Em **B)** observa-se as cavidade medular revestida por osteoclastos (**OC**) em lacunas de Howship. **C)** Presença de osteoclastos (**OC**) na superfície interna da sutura palatina.

b.3 Disjunção 10 dias

O espaço sutural estava ainda irregular. O tecido sutural, do terço superior, caracterizou-se por ser mais fibroso, com fibras colágenas desorganizadas, sendo que muitas não estavam contínuas em sua extensão, e algumas fibras estavam orientadas em sua inserção no osso (fibras de Sharpey). Muitos vasos sangüíneos, fibroblastos abundantes, e células grandes na superfície óssea, revelando atividade dos osteoblastos, e outros que pareciam osteoclastos devido à presença de áreas erosivas, foram evidenciados. Nos ossos de sustentação do tecido sutural deste período, as características eram semelhantes ao grupo anterior. Os fragmentos pequenos que persistiram caracterizavam-se por lacunas vazias ou invadidas por neutrófilos e osteoclastos. Notou-se na região anterior uma trabécula óssea se desenvolvendo no interior do tecido (linha mediana). As células em contato com a superfície óssea sutural irregular eram volumosas, representadas por osteoblastos e alguns osteoclastos. Portanto, se observou locais com franco processo de absorção óssea, onde se evidenciou a presença de alguns osteoclastos multinucleados ativos realizando absorção do tipo frontal, justapostos às superfícies. O tecido ósseo absorvido apresentou contorno irregular e poucos osteoplastos, reduzidos em volume e envoltos de tecido ósseo bem compactado (Figura 16).

Figura 16 - Região da sutura palatina mediana do grupo Experimental I (10º dia). **A)** visão panorâmica mostrando a sutura palatina mediana sem área hemorrágica. Em **B)** observa-se intensa proliferação de fibras colágenas. **C)** Presença de osteoblastos (**OB**) revestindo o tecido ósseo (**setas pequenas**) recém formado com a linha de repouso evidente (**setas grandes**) separando o osso antigo do novo.

c. Grupo Experimental II (disjunção com aplicação do laser)

c.1 Disjunção Imediata (tempo 0) + aplicação de laser

O tecido sutural mostrou-se muito modificado, com mudanças substanciais em seus componentes em função do trauma provocado pelo rompimento da sutura palatina mediana. Notou-se um alargamento desse espaço, principalmente na região anterior da sutura. No terço anterior, as fibras colágenas estavam rompidas e desorganizadas principalmente próximas ao tecido ósseo. Houve a presença de áreas hemorrágicas com lise celular e tecido sutural amorfo. A presença de infiltrado inflamatório de polimorfonucleares caracterizou este período. A presença de áreas semi-hializadas também foi evidente neste período.

A superfície óssea sutural mostrou-se ainda de forma regular, com a presença de tecido osteóide, margeado por alguns osteoblastos volumosos localizados justapostos às superfícies. As cavidades medulares apresentaram células adiposas, e, células com núcleos esféricos, demonstrando serem células jovens (precursores). Estas células eram principalmente neutrófilos jovens, com núcleos grandes ovóides e claros, entremeando as células esféricas escuras. No interior do osso, os osteócitos tinham núcleos picnóticos. Notaram-se poucos osteoclastos nesta região (Figura 17).

Figura 17 - Região da sutura palatina mediana do grupo Experimental II (dia 0). **A)** visão panorâmica mostrando a sutura palatina mediana com áreas hemorrágicas (*) em toda extensão da sutura. **B)** observam-se fibras colágenas (FC) aderidas na superfície óssea e vasos sanguíneos congestionados com hemácias (seta).

c.2 Disjunção 7 dias + aplicação de laser

O espaço sutural mostrou-se ainda amplo, quando comparado ao grupo controle. O tecido sutural em regeneração caracterizou-se por numerosos vasos sanguíneos, fibroblastos, células mononucleares e alguns neutrófilos (polimorfonucleares) concentrados nas proximidades de trabécula óssea sem osteócitos (lacunas vazias). O osso de sustentação do tecido sutural foi totalmente reabsorvido na metade anterior de um lado. Notaram-se pequenas áreas com erosão ou tecido osteóide depositado. A reabsorção óssea solapante e ativa não foi muito frequente neste período, sendo que os espaços medulares estavam recobertos por osteoblastos ativos. Notou-se a presença de trabéculas em desenvolvimento e tecido ósseo recém-formado recobrindo as bordas ósseas, principalmente no terço nasal (Figura 18).

Figura 18 - Região da sutura palatina mediana do grupo Exp II (7º dia). **A)** visão panorâmica mostrando a sutura palatina mediana com intensa proliferação de fibras colágagenas. **B)** observam-se fibras colágenas (**FC**) distribuídas em diversas direções e osteoblastos (**setas vazadas**) recobrindo a superfície óssea. **C)** osteoblastos (**OB**) ativos na superfície óssea e a linha de repouso entre o tecido ósseo antigo e o tecido ósseo novo (**setas**).

c.3 Disjunção 10 dias + aplicação de laser

O tecido sutural estava bastante celularizado em toda a sua extensão. Observou-se um acúmulo de pequenos vasos que ocorreu em todo tecido sutural sugestivo de proliferação vascular. Nosso critério para considerar, microscopicamente, a ocorrência de uma revascularização, através da coloração de H/E, foi a presença de um tecido vital (tecido conjuntivo com vasos sanguíneos, fibroblastos, outros tipos celulares na região central e áreas com fibras colágenas) sem a evidência de reação inflamatória, mas com poucas imagens sugestivas de degeneração de células. Notou-se também, numerosos fibroblastos, e grande quantidade de osteoblastos neste período. Em alguns locais os osteoblastos estavam concentrados indicando local de desenvolvimento de trabéculas ósseas. As células da superfície óssea sutural eram volumosas em vários pontos indicando atividade de síntese. Notou-se também a presença de osteócitos volumosos, mas ainda existiam áreas com osteoplastos vazios. A presença de tecido osteóide, recoberto por osteoblastos ativos foi evidente (Figura 19).

Figura 19 - Região da sutura palatina mediana do grupo Experimental II (10º dia). **A)** visão panorâmica mostrando a sutura palatina mediana com intensa proliferação de fibras colágenas. **B)** observam-se fibras colágenas (**FC**) distribuídas em diversas direções e osteoblastos (**setas pretas**) recobrendo a superfície óssea. **C)** osteoblastos ativos na superfície óssea (**cabeça de seta**) e osteócitos no interior do tecido ósseo recém-formado (**setas brancas**).

Figura 20 - Região da sutura palatina mediana do grupo Controle (A), Experimental I (B) e Experimental II (C). B) onde se observa o processo de reparo da sutura durante o período experimental.

5.2 Análise do RNAm

5.2.1 RT-PCR

Para a avaliação da influência do laser de baixa potência sobre a expressão gênica durante o reparo ósseo alveolar, os níveis de RNAm foram quantificados utilizando-se como referência a expressão do gene *GAPDH*, por meio de PCR quantitativo em tempo real para os grupos experimentais (I, II e III) e grupo controle (GC). O teste ANOVA, seguido do teste de Tukey, comparou os valores médios entre os grupos experimentais (I, II e III) e grupo controle (GC).

Os valores relativos à produção das proteínas *RANK*, *RANK-L*, *OPG* e *VEGF* durante a remodelação óssea em ratos induzidos à ERM e aplicação do LBP, nos diversos períodos analisados, encontram-se representados nas Figuras 21 à 34.

5.2.1.1 *RANK*

a) Grupo Controle, Experimental I, Experimental II e Experimental III

Figura 21 - Expressão de RNAm *RANK* no Grupo Experimental I, II e III, comparado com o controle. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns = não significante.

Observou-se que a disjunção maxilar interferiu na expressão de alguns genes ao longo do período experimental de forma que para o gene *RANK*, quando comparado com o grupo controle, demonstrou que, no grupo Experimental I houve um abrupto e significativo aumento a partir do 1º dia até o terceiro dia após a ERM, mas este aumento só foi significativo no 1º ($p < 0,01$) e 3º dia ($p < 0,001$) e uma diminuição gradual nos períodos seguintes, porém não significativo.

No grupo experimental II, houve uma significativa e abrupta redução no 2º ($p < 0,01$) e 3º dia ($p < 0,001$) quando comparado ao controle, aumento abrupto no 7º dia ($p < 0,001$) e, novamente uma abrupta diminuição nos níveis de RNAm de *RANK* aos 10 dias ($p < 0,001$).

No grupo experimental III (LBP por 3 dias), houve um significativo e abrupto aumento no 7º ($p < 0,001$) e uma redução acentuada no 10º dia ($p < 0,001$) quando comparado ao controle (Figura 21).

b) Experimental I, Experimental II e Experimental III

Figura 22 - Expressão de RNAm *RANK* no Grupo Experimental I e II. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 23 - Expressão de RNAm *RANK* no Grupo Experimental II e III. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. As reações foram realizadas em quadruplicata e os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$.

Figura 24 - Expressão de RNAm *RANK* no Grupo Experimental I e III. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$.

A análise intergrupo entre o grupo que teve só ERM (Exp I) e o que teve ERM + LBP com uma (Exp II) e com 3 aplicação (Exp III) demonstrou que o LBP diminuiu estatisticamente a expressão nos níveis de RNAm de *RANK* no período dos 3 primeiros dias, e só provocou um aumento no 7º dia do experimento ($p < 0,001$) (Figura 22 a 24).

Quando se compararam os grupos Exp II e ExpIII observou-se um aumento significativo nos níveis de RNAm de *RANK* no período 3 e 7 dias e uma diminuição estatisticamente significativa aos 10 dias ($p < 0,001$) (Figura 23).

5.2.1.2 *RANK-L*

a) Grupo Controle, Experimental I, Experimental II e Experimental III

Observou-se também que a expressão do *RANK-L* no grupo Exp I mostrou-se com níveis altos de RNAm no período de 1 a 7 dias e esse aumento nos níveis de RNAm elevou-se significativamente a partir de 24 horas do início do experimento ($p < 0,001$). No 10º dia houve uma redução abrupta no nível de RNAm, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) quando comparado com ao controle.

Observou-se que a expressão do *RANK-L* no grupo Exp II mostrou-se com níveis altos de RNAm nos períodos iniciais e esse aumento nos níveis de RNAm elevou-se significativamente no 1º, 2º e 7º dia ($p < 0,001$). Nos outros períodos observados houve uma redução acentuada, mas não houve diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle.

O grupo Exp III mostrou aumento significativo nos níveis de RNAm no 3º e 7º dia ($p < 0,001$) e redução acentuada no período de 10 dias ($p < 0,01$) quando comparada ao controle (Figura 25).

b) Experimental I, Experimental II e Experimental III

Figura 26 - Expressão de RNAm *RANK-L* no Grupo Experimental I e II. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns = não significante.

Figura 27 - Expressão de RNAm *RANK-L* no Grupo Experimental II e III. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Figura 28 - Expressão de RNAm *RANK-L* no Grupo Experimental I e III. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

A análise intergrupo revelou diferença estatisticamente significativa para 2 e 3 dias ($p < 0,001$), onde observou-se uma redução na expressão do RNAm de *RANK-L*, no grupo Experimental II em comparação com o Grupo Experimental I sendo que os outros períodos não foram significante apesar da tendência de aumento da expressão do RNAm de *RANK-L* aos 7 e 10 dias no grupo submetido a laserterapia (Exp II) (Figura 26).

Quando se avaliou a expressão de RNAm para o *RANK-L* a análise intergrupo demonstrou que no grupo que sofreu 3 aplicações de laser (Exp III) houve um abrupto e significativo aumento no 3º e 7º dia do experimento ($p < 0,001$) e uma diminuição significativa aos 10 dias ($p < 0,05$), quando comparado com o grupo que sofreu uma só aplicação de laser (Exp I e II) (Figuras 27 e 28).

5.2.1.3 OPG

a) Grupo Controle, Experimental I, Experimental II e Experimental III

Para a expressão do gene *OPG* a análise intragrupo demonstrou que, para o grupo Exp I houve um abrupto e significativo aumento no 1º dia ($p < 0,001$), e uma diminuição gradual nos períodos seguintes, porém não significativos. Aos 10 dias houve um ligeiro aumento, porém não significativo, em relação ao controle.

Na análise intragrupo, a expressão da *OPG* no grupo Exp II mostrou uma redução abrupta e acentuada aos 3 dias ($p < 0,05$). A partir deste momento o grupo Exp II apresentou níveis bastante altos de RNAm nos outros períodos avaliados 7 dias ($p < 0,01$) e 10 dias ($p < 0,001$), com diferença estatisticamente significativa, quando comparado ao controle.

A expressão da *OPG* no grupo Exp III mostrou um aumento abrupto e acentuado aos 7 e 10 dias ($p < 0,001$) com diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle (Figura 29).

b) Grupo Experimental I, Experimental II e Experimental III

Figura 30 - Expressão de RNAm *OPG* no Grupo Experimental I e II. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$, ns = não significante.

Figura 31 - Expressão de RNAm *OPG* no Grupo Experimental II e III. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p<0,001$; ns = não significativo.

Figura 32 - Expressão de RNAm *OPG* no Grupo Experimental I e III. Os dados correspondem a 10 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p<0,001$; ns = não significativo.

Quando comparamos o Grupo Experimental II com o Experimental I houve uma diminuição estatisticamente significante na expressão do RNAm de *OPG* para os períodos de 1 e 3 dias ($p<0,001$), sendo que posteriormente foi observado um aumento abrupto e significativo nos períodos de 7 dias ($p<0,001$) e 10 dias ($p<0,01$), (Figura 30).

No grupo que sofreu 3 aplicações de laser (Exp III) houve um abrupto e significativo aumento no 7º e 10º dia do experimento ($p<0,001$) sendo que aos 3 dias não houve diferença significativa, quando comparado com o grupo Exp I e II (Figura 31 e 32).

5.2.1.4 VEGF

a) Grupo Controle, Experimental I e Experimental II

Para a expressão do gene *VEGF* a análise intragrupo demonstrou que, para o grupo Exp I houve um abrupto e significativo aumento a partir do 1º dia quando comparado ao controle ($p<0,001$). Ao avaliar o RNA_m para *VEGF* observou-se que este gene estava expressos em todos os períodos e foram estatisticamente significante quando comparado ao controle. Da mesma forma, ao avaliar o RNA_m para *VEGF* no grupo Exp II, houve um abrupto e significativo aumento a partir do 1º dia quando comparado com ao controle ($p<0,001$). A partir de 24 horas houve uma redução do nível de expressão de RNA_m, porém continuou em nível mais elevado que o controle (Figura 33).

b) Grupo Experimental I e Experimental II

Figura 34 - Expressão de RNAm *VEGF* no Grupo Experimental I e II. Os dados correspondem a 7 dias de experimento. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns = não significante.

A análise intergrupo demonstrou um aumento significativo na expressão do RNAm de *VEGF* após 24 horas do experimento ($p < 0,01$) no grupo Exp II. A partir deste momento houve uma diminuição na expressão do *VEGF* no grupo experimental II quando comparado com o experimental I, sendo estatisticamente significativo aos 2 ($p < 0,05$), 3 ($p < 0,001$) e 7 dias ($p < 0,01$) (Figura 34).

5.2.2 Análise da expressão de proteína - Western Blotting

Esta análise foi feita para detectar a intensidade da expressão das proteínas *RANK*, *RANK-L*, *OPG* e *VEGF*, utilizando-se como referência a expressão protéica do *GAPDH*. O teste ANOVA, seguido do teste de Tukey, relacionou os valores médios entre os grupos experimentais (I, II e III) e grupo controle (GC).

Os valores densitométricos médios das bandas obtidas para a proteína *VEGF*, *RANK*, *RANK-L* e *OPG* durante a remodelação óssea em ratos induzidos à expansão rápida da maxila e aplicação do laser de baixa potência, nos diversos períodos analisados, encontram-se representados na Figura 35 a Figura 58.

5.2.2.1 RANK

a) Grupo Controle, Experimental I e Experimental II

As bandas obtidas para o *RANK* foram bem evidentes durante em todos os períodos experimentais.

A expressão protéica do *RANK* no grupo Experimental I mostrou aumento da produção protéica no primeiro dia até o sétimo dia pós-expansão quando comparada ao controle. A expressão protéica do *RANK* do dia 1º ao 7º foi respectivamente 0,42; 1,04; 1,3 e 0,69 vezes maior que o grupo controle. Aos 10 dias houve uma ligeira diminuição (0,15 vezes menor), mas não houve diferença estatística em relação ao controle (Figura 35).

A expressão protéica do *RANK* no grupo Experimental II mostrou que houve aumento significativo do primeiro (não significativo) ao sétimo dia (não significativo), em relação ao controle. Da mesma forma que o grupo Experimental I houve um declínio na expressão protéica do *RANK* no 10º dia, porém não significativo. A expressão protéica do *RANK* do dia 1º ao 7º foi respectivamente 0,35; 0,95; 1,04 e 0,25 vezes maior que o grupo controle, sendo que aos 10 dias foi 0,18 vezes menor que o controle (Figura 36).

Tanto no grupo experimental I quanto no II o período de 2 e 3 dias foram os períodos de maior expressão protéica para o *RANK*, sendo em média 1,04 e 1,3 (Exp I) e 0,95 e 1,04 (Exp II) vezes maior que o controle.

A expressão protéica do *RANK* no grupo Experimental III mostrou aumento da produção protéica apenas 3 dias pós-expansão quando comparada ao controle, sendo 0,66 vezes maior que o grupo controle, porém não significativo. Aos 7 e 10 dias houve uma ligeira diminuição, 0,55 (ns) e 0,97 ($p < 0,01$) respectivamente (Figura 37).

b) Experimental I, Experimental II e Experimental III

Figura 38 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas obtidos por Western Blotting para a proteína *RANK* do grupo experimental I e II, durante a osteogênese após a expansão rápida da maxila, nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ***p<0,001.

Figura 39 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas obtidos por Western Blotting para a proteína *RANK* do grupo experimental II e III, durante a osteogênese após a expansão rápida da maxila, nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ***p<0,001.

Figura 40 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas obtidos por Western Blotting para a proteína *RANK* do grupo experimental I e III, durante a osteogênese após a expansão rápida da maxila, nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ***p<0,001.

Quando comparamos o grupo experimental I com o II a expressão protéica do *RANK* no grupo Experimental II mostrou uma redução acentuada e significativa em todos os períodos quando comparada ao Experimental I. A expressão protéica do *RANK* no grupo Experimental II, do 1º ao 10º dia, foi em média, respectivamente 0,70; 0,72; 0,89; 1,07 e 0,63 vezes menor que o grupo Experimental I (Figura 38).

Na análise intergrupo observamos que a expressão protéica do *RANK* no grupo Experimental III mostrou um aumento acentuado e significativo em todos os períodos quando comparada ao grupo que recebeu uma só dose de irradiação (Exp II). A expressão protéica do *RANK* no grupo Experimental III, do 3º ao 10º dia, foi em média, respectivamente 2,07; 1,65 e 1,63 vezes maior que o grupo Experimental II (Figura 39).

Na análise intergrupo observamos que a expressão protéica do *RANK* no grupo Experimental III mostrou um aumento acentuado e significativo em todos os períodos quando comparada ao grupo de animais que não receberam laserterapia (Exp I) (Figura 40).

5.2.2.2 *RANK-L*

a) Grupo Controle, Experimental I e Experimental II

No grupo Experimental I mostrou aumento da produção protéica do dia 1 até o décimo dia pós-expansão quando comparada ao controle, sendo não significativo nos 2 primeiros períodos (0,04 e 0,13 vezes maior que o controle). A proteína *RANK-L* mostrou aumento significativo após o período de 3 dias permanecendo estável dos 3 aos 10 dias, sendo 0,58; 0,68 e 0,71 vezes maior que o controle (Figura 41).

Da mesma forma que o grupo Experimental I a expressão protéica do *RANK-L* no grupo Experimental II mostrou que houve aumento em todos os períodos, porém só foi significativo aos 3 e 10 dias, em relação ao controle. A expressão protéica do *RANK-L* do dia 1 ao 10^o foi respectivamente 0,06; 0,03; 0,19; 0,11 e 0,25 vezes maior que o grupo controle (Figura 42).

Tanto no grupo experimental I quanto no II os períodos de 3 e 10 dias foram os de maior expressão protéica para o *RANK-L*, sendo em média 0,58 e 0,71 (Exp I) e 0,19 e 0,28 (Exp II) vezes maior que o grupo controle.

A expressão protéica do *RANK-L* no grupo Experimental III mostrou aumento da produção protéica apenas aos 10 dias pós-expansão, mas não significativo quando comparada ao controle, sendo 0,05 vezes maior que o grupo controle neste período. Aos 3 e 7 dias houve uma ligeira diminuição de 0,13 ($p<0,01$) e 0,10 (ns) respectivamente, em relação ao controle (Figura 43).

Figura 41 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína *RANK-L* do grupo experimental I, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; *** $p<0,001$.

Figura 42 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína *RANK-L* do grupo experimental II, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Figura 43 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína *RANK-L* do grupo experimental III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; * $p<0,05$.

b) Experimental I, Experimental II e Experimental III

Figura 44 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína *RANK-L* do grupo experimental I e II, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Figura 45 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína *RANK-L* do grupo experimental II e III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$.

Figura 46 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína *RANK-L* do grupo experimental I e III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$.

Quando comparamos o grupo experimental I com o II a expressão protéica do *RANK-L* no grupo Experimental II mostrou uma redução acentuada e significativa em todos os períodos quando comparada ao Experimental I, com exceção do período de 24 horas que apesar de ser menor que o Experimental I, não foi significativo. A expressão protéica do *RANK-L* no grupo Experimental II, do 2º ao 10º dia, foi em média, respectivamente 0,18; 0,47; 0,65; e 0,51 vezes menor que o grupo Experimental I (Figura 44).

Na análise intergrupo observamos que a expressão protéica do *RANK-L* no grupo Experimental III mostrou uma redução acentuada e significativa em todos os períodos quando comparada ao grupo que recebeu uma só dose de irradiação (Exp II). A expressão protéica do *RANK-L* no grupo Experimental III, do 3º ao 10º dia, foi em média, respectivamente 0,38; 0,27 e 0,29 vezes menor que o grupo Experimental II (Figura 45).

Quando comparamos o grupo experimental I com o III a expressão protéica do *RANK-L* no grupo Experimental III apresentou níveis significantemente baixos em todos os períodos quando comparada ao Experimental I (Figura 46).

5.2.2.3 OPG

a) Grupo Controle, Experimental I e Experimental II

Figura 47 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína *OPG* do grupo experimental I, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; * $p<0,05$.

Figura 48 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína *OPG* do grupo experimental II, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; *** $p<0,001$.

Figura 49 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína *OPG* do grupo experimental III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

No grupo Experimental I houve uma diminuição da expressão protéica de *OPG* em todos os períodos analisados, sendo que os períodos 1, 2, 3 e 7 dias não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle. Apenas no período de 10 dias a expressão protéica do *OPG* foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) sendo em média 0,24 vezes menor em relação grupo controle (Figura 47).

No grupo experimental II observamos que a expressão da proteína *OPG* teve um aumento significativo ($p < 0,001$) apenas no período de 24 horas (0,37 vezes maior que o controle), seguido de um declínio que se manteve constante e não significativo até o período de 10 dias, sendo 0,01 (dia 2); 0,13 (dia 3); 0,09 (dia 7) e 0,15 (dia 10) vezes menor que o controle (Figura 48).

A expressão protéica da *OPG* no grupo Experimental III mostrou diminuição da produção protéica em todos os períodos pós-expansão, sendo significativo aos 3 ($p < 0,05$) e 7 ($p < 0,01$) dias quando comparada ao controle, apresentando 0,55 e 0,68 vezes menor que o grupo controle nestes períodos. Aos 10 dias também houve uma ligeira diminuição de 0,28; porém não significativo em relação ao controle (Figura 49).

b) Experimental I, Experimental II e Experimental III

Figura 50 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína *OPG* do grupo experimental I e II, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; **p<0,01; ***p<0,001.

Figura 51 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína *OPG* do grupo experimental II e III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. **p<0,01; ***p<0,001.

Figura 52 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína *OPG* do grupo experimental I e III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. **p<0,01; ***p<0,001.

Quando comparamos o grupo experimental I com o II a expressão protéica da *OPG* no grupo Experimental II mostrou um aumento acentuado e significativo no 1º, 3º e 10º dia após a expansão quando comparada ao Experimental I. No 2º e 7º dia também houve um aumento, mas não significativo. A expressão protéica da *OPG* no grupo Experimental II, do 1º ao 10º dia, foi em média, respectivamente 0,33; 0,02; 0,23; 0,27 e 0,29 vezes maior que o grupo Experimental I (Figura 50).

Na análise intergrupo observamos que a expressão protéica da *OPG* no grupo Experimental III mostrou um aumento acentuado e significativo em todos os períodos quando comparada aos grupos I e II (Figuras 51 e 52). A expressão protéica da *OPG* no grupo Experimental III, do 3º ao 10º dia, foi em média, respectivamente 0,50; 0,41 e 0,75 vezes maior que o grupo Experimental II.

5.2.2.4 VEGF

a) Grupo Controle, Experimental I, Experimental II e Experimental III

Figura 53 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína *VEGF* do grupo experimental I, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Figura 54 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína *VEGF* do grupo experimental II, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; * $p < 0,05$.

Figura 55 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína *VEGF* do grupo experimental III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. ns=não significativo; * $p < 0,05$.

No grupo Experimental I houve uma diminuição da expressão protéica de *VEGF* em todos os períodos analisados, sendo que só nos períodos de 2 ($p<0,01$) e 10 ($p<0,05$) dias apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle (0,52 e 0,4 vezes menor). A expressão protéica do *VEGF* nos períodos de 1, 3 e 7 dias foi em média 0,19 (ns); 0,27 (ns) e 0,26 (ns) vezes menor em relação grupo controle (Figura 53).

No grupo experimental II observamos que a expressão da proteína *VEGF* teve um aumento, porém não significativo nos períodos de 1, 3 e 7 dias sendo 0,01; 0,08 e 0,03 vezes maior que o controle (ns). O único período significativo foi o de 2 dias ($p<0,05$) onde se observou um declínio do *VEGF*, sendo em média 0,23 vezes menor que o controle (Figura 54).

A expressão protéica do *VEGF* no grupo Experimental III mostrou um aumento em todos os períodos pós-expansão, porém só significativo aos 10 ($p<0,05$) dias quando comparada ao controle, apresentando em média 0,57 vezes maior que o grupo controle neste período. Aos 3 e 7 dias também houve um ligeiro aumento médio de 0,41 e 0,53 vezes em relação ao controle, porém não significativo (Figura 55).

b) Grupo Experimental I, Experimental II e Experimental III

Figura 56 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína *VEGF* do grupo experimental I e II, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$.

Figura 57 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína *VEGF* do grupo experimental II e III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$.

Figura 58 - Gráfico dos valores densitométricos das bandas utilizadas para a proteína *VEGF* do grupo experimental I e III, durante a osteogênese após a ERM nos diversos períodos analisados. Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. *** $p < 0,001$.

Quando comparamos o grupo experimental I com o II a expressão protéica do *VEGF* no grupo Experimental II mostrou uma redução acentuada e significativa em todos os períodos pós-expansão quando comparada ao Experimental I. A expressão protéica do *VEGF* no grupo Experimental II, do 1º ao 10º dia, foi em média, respectivamente 0,98; 0,89; 0,83; 0,89 e 0,79 vezes menor que o grupo Experimental I (Figura 56).

Na análise intergrupo observamos que a expressão protéica do *VEGF* no grupo Experimental III mostrou um aumento acentuado e significativo em todos os períodos quando comparado ao grupo que recebeu uma só dose de irradiação (Exp II). A expressão protéica do *VEGF* no grupo Experimental III, do 3º ao 10º dia, foi em média, respectivamente 1,18; 1,35 e 1,43 vezes maior que o grupo Experimental II (Figura 57). Este resultado foi semelhante quando comparamos com o grupo Experimental I, apresentando aumento da expressão do *VEGF* após o 3º dia do experimento.

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos vem aumentando o número de pacientes com maloclusões causadas pela maxila atrésica na clínica ortodôntica. O tratamento desta maloclusão se faz com a expansão rápida da maxila (ERM), ou seja, com o alargamento da arcada dentária superior. Porém, para obter êxito no tratamento ortodôntico, há necessidade de formação óssea na sutura palatina mediana após a disjunção da maxila, evitando-se dessa forma a recidiva do tratamento. O laser de baixa potência vem sendo utilizado na Odontologia com o objetivo de acelerar a cicatrização de tecidos moles e duros, mas ainda de maneira empírica, pois não existe um protocolo único para a sua utilização (ANGELETTI et al., 2010). Dado a importância funcional da participação das proteínas ósseas no reparo tecidual e a escassez de estudos que mostram ao nível molecular a produção das moléculas *OPG*, *RANK*, *RANK-L* e *VEGF* após a ERM, e aplicação do laser de baixa potência (LBP), o presente estudo propôs identificar e quantificar essas proteínas que participam do processo de reparo ósseo em diferentes períodos de ERM e aplicação do LBP.

Portanto o objetivo desta pesquisa foi verificar a participação das proteínas envolvidas com a remodelação óssea da sutura palatina mediana após a aplicação de forças ortopédicas, trazendo com isso novas informações a respeito da dinâmica do tecido ósseo, a nível molecular e uma melhor compreensão da biologia do tecido ósseo, ajudando o Ortodontista entender o mecanismo da remodelação óssea após a ERM. Da mesma forma foi possível verificar a ação do LBP na remodelação óssea e a possibilidade desse mecanismo diminuir o tempo de contenção após a disjunção maxilar, acelerando o reparo ósseo. Visando proporcionar uma melhor interpretação dos resultados obtidos neste trabalho, serão discutidos: 1) os aspectos referentes ao modelo experimental e a metodologia utilizada para obtenção dos resultados; 2) Influência dos fatores de crescimento e citocinas nas células ósseas; 3) os resultados da expressão das proteínas *RANK*, *RANK-L* e *OPG* e as correlações encontradas entre o padrão de expressão do sistema *RANK/RANK-L/OPG* na remodelação óssea após a aplicação de forças ortodônticas; 4) a relação dos vasos sanguíneos e a formação óssea; e 5) possíveis diferenças quanto ao perfil de

formação óssea relacionado à aplicação do LBP, mediante análise dos dados obtidos nesta pesquisa comparando-os com outros trabalhos existentes na literatura.

Os modelos animais têm sido largamente utilizados em benefício da compreensão da remodelação óssea após a aplicação de forças ortodôntica e/ou ortopédicas. Embora não se possam esperar respostas idênticas e agressões semelhantes entre as diferentes espécies, estes modelos podem funcionar como exemplos de tendências biológicas e fornecer informações importantes ao pesquisador. Neste sentido, os ratos geralmente são alvo de estudos experimentais, para este propósito, devido à disponibilidade, facilidade de manipulação, grandes semelhanças com os humanos, baixo custo da pesquisa e padronização da amostra (OSAWA, SHIMIZU & KARIYA, et al 1998; SAITO & SHIMIZU, 1997; SAWADA & SHIMIZU, 1996; TRELLES & MAYAYO, 1987)

Em geral, o melhor modelo para remodelação óssea é aquele capaz de mimetizar a situação clínica. Para tanto, vários sistemas testes têm sido utilizados, entre eles, o reparo de fraturas, a perda segmental em osso longo, o defeito de tamanho crítico em crânio e de várias outras formas de não união. O modelo de fraturas em ossos longos tem permitido estabelecer, baseados em critérios histológicos e moleculares, as fases da progressão da reparação de fratura e a sua regulação por diversos fatores de crescimento (TRELLES & MAYAYO, 1997; GLOWACKI et al., 1998; KHADRA et al., 2004a, KHADRA et al., 2004b; ROBLING, CASTILLO & TURNER 2006, WEBER et al., 2006; AL-AQL et al., 2008). Hoje sabemos que os eventos que ocorrem na reparação de fraturas representam uma recapitulação dos mecanismos básicos da ossificação e crescimento ósseo embrionário e fetal (BLENMAN, CARTER & BEAUPRE, 1989; CAMPBELL & KAPLAN, 1992; FERGUSON et al., 1998). Outros modelos "*in vivo*" foram propostos e largamente utilizados no estudo da reparação óssea, como por exemplo: o da reparação de alvéolo dentário de incisivo central superior de ratos após exodontia e o da reparação de defeito ósseo uni-cortical criado experimentalmente em fêmur ou tíbia de coelhos. No entanto, esses modelos produzidos cirurgicamente tem o inconveniente de apresentarem capacidade de reparação espontânea, o que foi evitado com a utilização da ERM, executada na presente pesquisa.

Embora conscientes de algumas limitações com a utilização de ratos como modelo experimental, optou-se como modelo experimental, o uso destes animais,

utilizando um dispositivo ortodôntico para realizar a expansão rápida da maxila, de tal forma a manter separadas as duas hemi-maxilas, e procurou-se identificar a presença de algumas moléculas específicas da remodelação óssea, com e sem aplicação do laser de baixa potência.

Quanto a estabilidade do aparelho disjuntor e a remodelação da sutura, os resultados mostraram que durante todo o período experimental não houve movimentação dos incisivos superiores (Figuras 5 e 6) e nem diferenças entre os grupos experimentais, portanto não houve interferência nos eventos iniciais da remodelação óssea confirmando que o aparelho disjuntor permaneceu bem fixado entre os dentes. Referente à largura da abertura da sutura, observamos que ao analisar estatisticamente os grupos, notamos que todos tiveram uma diminuição significativa na largura da abertura da sutura no transcorrer do período experimental, mostrando que estão acontecendo processos de remodelação óssea na região da sutura (Figuras 7 a 12).

Este modelo proporcionou uma expansão cirúrgica fechada da sutura palatina mediana, porém sem o inconveniente dos procedimentos cirúrgicos convencionais, uma vez que não há a exposição do periósteo durante este procedimento, evitando-se desta forma qualquer tipo de infecção ao local. Tal procedimento é o mesmo princípio que se utiliza rotineiramente em humanos quando se deseja expandir a arcada dentária superior, com o objetivo de alargar a base maxilar. Neste experimento todos os animais permaneceram saudáveis e não houve perda de peso de modo expressivo durante o período experimental devido ao uso do dispositivo ortodôntico. Não houve nenhuma dificuldade durante a instalação do aparelho expensor e, o mesmo não causou nenhum desconforto aparente aos animais. Ao mesmo tempo, foi verificada a abertura da sutura palatina mediana, que foi comprovada através de radiografias oclusais de controle bem como pelas análises histológicas pós-expansão (Figura 13 à Figura 20), mostrando a efetividade de tal procedimento.

Os efeitos de irradiação de laser em regeneração de osso na sutura não estão totalmente esclarecidos, pois a maioria dos estudos para verificar a formação óssea utiliza campos cirurgicamente preparados, que possuem um potencial natural de reparação, além disso, esses campos se localizam normalmente fora da cavidade bucal. O uso potencial do laser na biomodulação do reparo ósseo através de suas

propriedades fotoquímicas e fotobiológicas têm sido estudadas por pesquisadores em todo o mundo com o objetivo de proporcionar ao paciente, uma maior rapidez na cicatrização óssea, amenizando o quadro de edema pós-cirúrgico, melhorando a cicatrização tecidual e, portanto, menor desconforto pós-operatório. Porém, os efeitos do LBP no osso ainda são controversos, pois estudos têm mostrado resultados conflitantes (KARU et al., 1989; IN DE BRAEKT et al., 1991; NISSAN et al., 2006; SEIFI et al., 2007; AI-AQL et al., 2008; ANGELETTI et al., 2010). A terapia com laser tem sido considerada como responsável pela biomodulação na cicatrização de fraturas ósseas em modelos animais, baseado em estudos morfogenéticos, bioquímicos e de microscopia eletrônica. Desta forma a laserterapia tem sido apontada como capaz de modular várias respostas biológicas afetadas por alguns fatores envolvidos com o modo da radiação, tais como: dose total de energia, comprimento de onda, densidade de potência, tipo de emissão e tempo de radiação (BRUGNERA JÚNIOR & PINHEIRO, 1998; BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003). Os resultados da presente pesquisa mostraram uma aparente melhora na remodelação óssea quando se comparou o grupo irradiado com o não irradiado, resultados estes que serão discutidos posteriormente. Porém para esclarecer a efetividade da laserterapia na remodelação óssea é necessária comprovação clínica de médio e longo prazo, que possam demonstrar o desempenho do LBP.

A ocorrência de uma fratura óssea ou de uma deformação no osso como no caso de aplicação de forças ortodônticas e/ou ortopédica provoca solubilização e liberação de proteínas. Uma vez ativadas, elas ligam-se a receptores específicos da membrana celular dos osteoblastos e outras células envolvidas no reparo ósseo, estimulando a expressão de genes responsáveis pelo desencadeamento e perpetuação do processo de remodelação óssea (UEDA & SHIMIZU, 2003; PINHEIRO et al., 2003; ROBLING et al., 2006; SEIFI et al., 2007; AI-AQL et al., 2008). Portanto o processo de reparo está diretamente dependente da resposta celular local ao estímulo gerado pelos fatores de crescimento do tecido ósseo (WLODARSKI, 1990; SEIFI et al., 2007; AI-AQL et al., 2008).

Porém, para que uma resposta tecidual favorável ocorra, algumas condições são essenciais, dentre elas inclui-se a presença de células e nutrição adequadas das mesmas e um estímulo para a reparação óssea. Os mecanismos exatos implicados *in vivo* na gênese do tecido ósseo são controversos, envolvendo uma

complexa interação de fatores reguladores locais e sistêmicos. A ação destes mediadores promove um equilíbrio contínuo entre formação (osteoblastos) e reabsorção (osteoclastos) óssea. A aplicação de uma força ortodôntica e/ou ortopédica sobre o osso representa uma quebra desta relação, desencadeando uma série de eventos intra e extracelulares que culminam com o reparo do tecido lesado (SAITO & SHIMIZU, 1997; GIORDANO, GIORDANO & KNACKFUSS, 2003; SEIFI et al., 2007). A força ortopédica produzida com o dispositivo utilizado nesta pesquisa produziu a abertura da sutura palatina mediana rompendo o equilíbrio do tecido ósseo e sutural. A principal vantagem desse procedimento é pelo fato de ser intraoral e o procedimento ser fechado (campo não cirúrgico), não houve a presença de infecção após este procedimento, o que poderia interferir nos resultados apresentados aqui. Estes achados foram confirmados através do exame histológico realizado nesta pesquisa. Apesar de apresentar um processo hemorrágico inicial na sutura palatina mediana, o que é comum neste procedimento, não foi observado nos exames histológicos o processo infeccioso na região. A presença de algumas células inflamatórias foi devido ao trauma provocado pela ERM e não por infecção no campo.

Tem sido relatado, que uma vez ativadas, as proteínas ligam-se a receptores específicos da membrana celular de osteoblastos e em outras células envolvidas no reparo, estimulando a expressão de genes responsáveis pelo desencadeamento e perpetuação do processo de neoformação óssea. Em termos de interação célula-célula, manifestam duas formas distintas de atuação. Estimulam localmente a proliferação e diferenciação celular e, síntese de nova matriz protéica (efeito parácrino); além disso, possuem um mecanismo de autorregulação sobre os osteoblastos, induzindo contínua expressão dos fatores de crescimento do tecido ósseo (efeito autócrino).

O mecanismo do complexo celular responsável pela adaptação funcional dos ossos está começando a ser decifrado através da biologia molecular (BRIGHTON et al., 1996; OWAN et al., 1997; COWIN, 1998). Os sinais intracelulares são complexos e ainda não estão totalmente entendidos. É sabido que as cargas comprimem e dobram o tecido ósseo, causando uma deformação local ou estiramento da matriz extracelular e cria um fluxo do fluido nos espaços pericelulares, especialmente na extensa rede de canálculos dos osteócitos

(COWIN, 2007): Isso pode ser observado no Grupo Experimental I, que só sofreu a ERM, que caracteriza um trauma ao tecido ósseo, onde se observou um aumento imediato (24 horas) da expressão do RNAm de todas as proteínas estudadas, concordando com relatos da literatura (HILL, 1998), onde mostram que a força ortodôntica pode ser suficiente para ativar essas proteínas. O conceito atual de remodelação óssea se baseia na hipótese de que os precursores osteoclásticos se ativam e se diferenciam em osteoclastos e iniciam o processo de reabsorção óssea sendo seguida por uma fase de formação óssea. Na presente pesquisa o trauma ao tecido ósseo provocado pela ERM ativou o aumento na expressão do RNAm de todas as proteínas 24hs após a aplicação da força ortodôntica, mas apenas a expressão da proteína *RANK* e *VEGF* foi expressiva imediatamente após a ERM.

A sequência de ocorrências no ciclo da remodelação óssea normal é sempre a mesma, ou seja, reabsorção óssea osteoclástica, uma fase reversa e formação óssea osteoblástica para reparar o defeito. A formação óssea resulta de uma complexa cascata de ocorrências que envolvem a proliferação de células mesenquimais primitivas, diferenciação em células precursoras osteoblásticas, maturação dos osteoblastos, formação de matriz e, finalmente, mineralização. Quando existe uma cavidade reabsorvida, os osteoblastos convergem para ela e formam o osteóide que começam a mineralizar-se após 13 dias. Os osteoblastos continuam a formar e mineralizar o osteóide até que a cavidade seja totalmente preenchida. O tempo para preencher uma cavidade em qualquer ponto sobre a superfície óssea é de 124-168 dias em humanos normais (HILL, 1998), e esse tempo passa a ser de 21 dias para ratos.

As células estromais, ativadas pelos osteócitos, produzem *M-CFS* (fator estimulante colônia de macrófagos) as quais estimulam a diferenciação celular em pré-osteoblastos. Estas células podem também dividir e produzir pré-osteoblastos que expressam o *RANK-L* em suas superfícies. O *RANK-L* ativa o receptor *RANK* nas membranas dos pré-osteoclastos, causando a fusão dessas células em osteoclastos multinucleares maduros. Uma vez que a transcrição para osteoclastos maduros é atingida, a atividade de reabsorção parece ser regulada pelo *RANK-L*. Os osteoclastos maduros desenvolvem uma borda denteada e reabsorve o osso. A *OPG* produzida pelos osteoblastos maduros pode se unir ao *RANK-L*, inibindo a atividade deste, e conseqüentemente dos osteoclastos (ROBLING, CASTILLO &

TURNER 2006). Deste modo o estroma celular pode controlar a osteoclastogênese aumentando a expressão do *RANK-L* ou diminuindo a expressão de *OPG* competitiva.

Por meio da presente pesquisa observou-se no grupo submetido apenas à força ortopédica (ERM) que o *RANK-L* está envolvido com a regulação da indução do processo de osteoclastogênese, pois foi estatisticamente significativa em todos os períodos iniciais ($p < 0,001$) enquanto que a *OPG* só foi significativa após 24 horas da aplicação da força ortodôntica, demonstrando que neste grupo durante os 10 primeiros dias houve predomínio de reabsorção óssea, o que pode ser comprovado também pela expressão do *RANK*, pois o mesmo foi significativo no primeiro e terceiro dia. Esses resultados também foram confirmados pelo Western blotting, onde a expressão do *RANK-L* aumentou significativamente até 10 dias em todos os grupos e a *OPG* diminuiu a partir de 24 horas, demonstrando que a reabsorção óssea predominou nos períodos iniciais e a formação nos períodos finais do experimento, o que foi comprovado com a análise histológica (Figura 19; Figuras 30 a 32; Figuras 50 a 52).

Quando se observou a análise estatística de RT-PCR entre o grupo controle e o grupo que foi irradiado com laser após a ERM observou-se que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) na expressão de RNAm para *RANK-L* nos períodos iniciais e de *OPG* nos períodos finais demonstrando que com a irradiação há uma aceleração do processo de remodelação óssea, onde nos períodos iniciais houve uma reabsorção pelo predomínio de *RANK-L* e nos períodos finais houve neoformação óssea pelo predomínio de *OPG* (Figuras 27, 28, 31 e 32). Tal comportamento também foi observado nos animais irradiados com três aplicações de laser. Estes resultados foram também confirmados pela análise protéica realizada pela técnica de Western Blotting.

A literatura as pesquisas vem mostrando que um dos fatores que controla a diferenciação dos osteoclastos é a proteína *RANK-L* presente na superfície dos precursores de osteoclastos e a *OPG* que compete pela ligação com *RANK-L* inibindo a osteoclastogênese (YASUDA et al., 1998a, YASUDA et al. 1998b; LOW et al., 2005). No atual trabalho o período de maior expressão protéica (Western blotting) do *RANK-L* coincidiu com a presença de um maior número de osteoclastos (histológico), ou seja, entre 3 e 10 dias, como observado também para o *VEGF*.

Para a *OPG* período de maior expressão protéica foi a partir de 10 dias o que coincidiu com a presença de um maior número de osteoblastos (histológico). A expressão protéica foi sempre mais evidente quantitativamente para o *RANK-L* do que para a *OPG*.

A angiogênese é um processo complexo que resulta na remodelação da matriz extracelular, secreção de enzimas proteolíticas, migração das células endoteliais, proliferação, diferenciação capilar e anastomoses (FOLKMAN & KLAGSBRUN 1987a; FOLKMAN & SHING 1992), e esse processo é regulado pela interação de inúmeras citocinas e fatores de crescimento (GARANT 2003). O *VEGF* é a chave reguladora da angiogênese fisiológica durante o crescimento esquelético e funções reprodutivas (FERRARA 1996; FERRARA, 2000; FERRARA, GERBER & LECOUTER, 2003). O *VEGF* está envolvido no processo de angiogênese no qual os novos vasos sanguíneos são formados a partir de outros vasos pré-existentes, funcionando como um potente fator pró-sobrevivência (antiapoptótico) para células endoteliais (FERRARA, 1996; FERRARA, GERBER & LECOUTER, 2003; FERRARA, 2004) em vasos recém-formados. Portanto, é considerado um dos responsáveis pela promoção de revascularização dos tecidos isquêmicos (KORANSKY et al., 2002; GOUNIS et al., 2005) e formação de vasos sanguíneos (YANCOPOULOS et al., 2000).

Nos grupos experimentais (irradiado e não irradiado) ocorreu o aumento da expressão de *VEGF* pelas células ósseas, indicando, a ocorrência de uma íntima relação entre a angiogênese, o processo reabsorptivo e a formação óssea/medular. A expressão de *VEGF* é induzida por vários mediadores inflamatórios, tais como a interleucina-6, interleucina-1, prostaglandinas e, também, pela endotoxina LPS (lipopolissacarídeos) (GOODIS & SAEKI, 1997; STASHENKO et al., 1998; BOTERO et al., 2003). O *VEGF* é em grande parte responsável pelo estímulo da proliferação e diferenciação de células endoteliais, e, conseqüentemente, pelo aumento da permeabilidade vascular e formação de novos vasos sanguíneos, sendo um potente fator angiogênico (FERRARA, GERBER & LECOUTER, 2003; FERRARA, 2004). Portanto, sua alta expressão durante o período de inflamação contribui para a formação de edema e consequente dor.

No presente estudo os resultados obtidos RT-PCR mostraram que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) na expressão de RNAm para

VEGF no grupo que sofreu a ERM (Exp I) e naquele que foi submetido à disjunção e aplicação de laser (Exp II) em todos os períodos em relação ao controle, demonstrando que o trauma estimula a liberação de *VEGF* na tentativa de aumentar a vascularização da área, provavelmente devido ao processo inflamatório presente no local produzido pelo trauma da ERM. Quando se comparou os dois grupos (laser e não laser) se observou que a laserterapia diminuiu a expressão de RNAm do *VEGF* a partir de 48 horas após a ERM, sendo que após 24 horas houve uma diminuição na expressão do *VEGF* no grupo irradiado, provavelmente devido ao controle do processo inflamatório que este procedimento produz, como relatado na literatura. Este resultado foi confirmado pelo western blotting, sendo que quando se comparou o grupo com uma irradiação e com 3 aplicações de laser observa-se que doses por 3 dias consecutivos mostrou uma maior expressão de *VEGF* do que o grupo que sofreu apenas uma irradiação (Figura 57).

Elevados níveis de *VEGF* têm sido detectados durante a fase inicial do processo inflamatório e estão presentes em tecidos como células endoteliais inativas, confirmando a importância do *VEGF* em potencializar a angiogênese numa variedade de tecidos, respondendo a diversos sinais. Os elevados níveis de *VEGF* observados na presente pesquisa confirmam os relatos da literatura, mostrando que não só o trauma ao tecido ósseo como também a irradiação a laser estimulou a liberação da proteína *VEGF*, observado pelo Western blotting. Entretanto, várias questões básicas ainda não estão completamente respondidas. Há fortes evidências de que as ações do *VEGF* no endotélio vascular são complexas e não limitadas somente à indução do crescimento vascular. Sabe-se que, o *VEGF* é um potente fator angiogênico, e que seus receptores têm sido localizados principalmente em células endoteliais. Porém, atualmente tem-se demonstrado que o *VEGF* também participa de vários outros eventos celulares e teciduais que envolvem a formação e a remodelação do tecido cartilaginoso e ósseo. Algumas implicações clínicas interessantes do *VEGF* estão relacionadas ao seu envolvimento no processo de angiogênese óssea e formação óssea endocondral. A aplicação desse fator de crescimento vascular endotelial pode ser útil para melhorar o processo de revascularização em casos de fraturas não consolidadas e em outras condições (FERRARA, GERBER & LECOUTER, 2003), como por exemplo, em casos de necroses ósseas (KATSUBE et al., 2005) bem como no controle do processo

inflamatório, o que pode ser verificado no presente experimento com a aplicação do laser de baixa potência. Observou-se nesse experimento que o LBP aumentou a expressão de RNAm do *VEGF* 24hs após a ERM imediata, e após este período, houve uma diminuição demonstrando o controle do processo inflamatório produzido pelo laser, dados que podem ser confirmados pelo exame histológico.

Um aspecto relevante do *VEGF* é que o mesmo tem sua resposta altamente vinculada ao tipo de meio ambiente em que se encontra (POLVERINI, 2002). Além dos fatores de crescimento e citocinas a tensão de oxigênio é um regulador importante do *VEGF* (HICKLIN & ELLIS, 2005). Condições de hipóxia desempenham um papel importante na regulação da expressão de uma variedade de genes. A expressão de *VEGF* mRNA é induzida por exposição à baixa tensão de oxigênio. Esta condição desempenha a função de recrutar vasos sanguíneos para áreas de tecido isquêmico (FERRARA, GERBER & LECOUTER, 2003). Em contraste, condições de hipóxia normal, sub-regulam a produção de *VEGF* e promovem a regressão de vasos sanguíneos recém-formados. Quando as condições de hipóxia predominam, como no caso do crescimento tumoral, a expressão de *VEGF* persiste, potencializando, assim, o processo de angiogênese e, conseqüentemente, a progressão tumoral. Esse fator de crescimento vascular endotelial tem sido relacionado com a angiogênese patológica associada a tumores, alterações neovasculares intra-oculares e outras condições. A literatura (FERRARA, 2004) suporta a hipótese de que o *VEGF* é o maior mediador da angiogênese associada com várias alterações. De fato, *VEGF* e seus inibidores constituem uma das melhores alternativas de tratamento para a inibição de tumores. A angiogênese está intimamente relacionada com o crescimento, progressão e metástase dos tumores. Apesar de o *VEGF* ser considerado o fator central na regulação do processo de angiogênese, não está relacionado somente ao câncer. Trabalhos encontrados na literatura (BOOTH et al., 1998), demonstraram a presença do *VEGF* na doença periodontal inflamatória crônica, mas também, observaram a presença de *VEGF* em áreas livres de inflamação (periodonto saudável) ratificando o papel do mesmo na angiogênese fisiológica da gengiva e ambiente periodontal, o que está de acordo com o presente experimento, pois a expressão de RNAm *VEGF* foi observado no grupo controle.

No presente experimento houve uma condição praticamente inevitável de hipóxia gerada por isquemia nos tecidos da sutura palatina mediana após aplicação da força ortopédica, o mesmo sendo relatado na literatura, o que por si só já seria um estímulo para a expressão de *VEGF* (ARTESE et al., 2002; HARIK, HRITZ & LAMANNA, 1995; PE'ER et al., 1995), sendo este um estímulo fundamental que explicaria a grande expressão desta citocina, tanto no grupo experimental I quanto no Grupo Experimental II. Os resultados desse estudo mostraram níveis de *VEGF* sendo expresso em maior quantidade nos grupos experimentais do que os níveis basais encontrados (Grupo controle). Baseando-se em informações relatadas por outros autores (BOOTH et al., 1998), que afirmam que macrófagos e fibroblastos parecem ser atraídos para áreas com baixa oxigenação, pode-se supor que a expressão de *VEGF* na área da sutura está significativamente aumentada em um primeiro momento, em virtude da tração das fibras da sutura palatina. À medida que a irrigação local se restabelece, desencadeada por mecanismos angiogênicos desempenhados, sobretudo, pelas células endoteliais, secretoras de *VEGF*, retomam os níveis normais de oxigenação local. Esse dado, por sua vez, explicaria a diminuição de *VEGF* num segundo tempo de avaliação, onde há caracteristicamente novos vasos ainda secretando *VEGF*, mas não mais ocorrem células elásticas, características dos três primeiros dias de tracionamento das fibras. O nível de expressão de *VEGF*, ao final de sete dias voltou a subir. Isso pode ser explicado pela evidência histológica de reorganização do tecido de sustentação o que está de acordo relatos da literatura.

A importância da vascularização tem sido amplamente estudada durante o processo de ossificação, associada à liberação de fatores osteogênicos, como o *VEGF*, culminando com o aumento da vascularização e da liberação de fatores indutores da osteoclastogênese e osteoblastogênese e pelas células endoteliais, além de, servir de via de transporte para as células hematopoiéticas com a chegada ao local dos precursores dos osteoclastos que degradam a matriz cartilaginosa, ativando a osteoblastogênese a partir da diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas (IMHOF & DUNON 1997; OLSEN, REGINATO & WANG 2000). A comunicação parácrina, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, entre as células endoteliais e osteoblásticas (via junções gap) controla o processo angiogênico necessário para a formação e o reparo ósseo (VILLARS et al., 2000; VILLARS et al., 2002).

Durante a ossificação endocondral, os condrócitos hipertróficos secretam *VEGF* para que a vascularização seja estabelecida, trazendo para o local, componentes hematopoiéticos, que se diferenciam em osteoclastos para a degradação da cartilagem mineralizada. Este gatilho, ativa a osteoblastogênese a partir das células progenitoras mesenquimais, culminando com a produção da matriz óssea e medular (OLSEN, REGINATO & WANG, 2000). Para o recrutamento de osteoclastos para as áreas de reabsorção, precursores de osteoclastos necessitam aderir e migrar através do endotélio em um fino e regulado mecanismo similar ao processo de transmigração de leucócitos e monócitos (IMHOF & DUNON, 1997). Atualmente, tem sido proposto que, o endotélio pode direcionar os precursores de osteoclastos para áreas específicas do tecido ósseo, ajudando a controlar o processo reabsortivo (PARFITT, 2000; PARFITT, 2001; PARFITT, 2002).

Na região submetida à força ortopédica (disjunção), ocorreu um aumento notável na expressão de *VEGF*, tanto no grupo experimental I quanto no II quando comparado com o controle, sendo em grande parte expresso pelo número elevado de osteoclastos, verificados no exame histológico, nesses períodos. Este fator de crescimento pode participar da função de remoção do tecido necrótico e a presença de maior suprimento sanguíneo na zona de tensão foi uma constante neste experimento. Pesquisas evidenciam que a injeção de *VEGF* acelera o processo de diferenciação osteoclástica. Kaku et al. (2001) investigaram se o *VEGF* recombinante estimularia a diferenciação de colônias de osteoclastos durante o movimento ortodôntico experimental. Para isso, injetaram *VEGF* recombinante no sulco gengival dos incisivos superiores de ratos e, após aplicação de força biomecânica, observou que o número de osteoclastos no lado de pressão foi muito maior. Os autores, diante dos resultados obtidos, sugeriram que a administração local de *VEGF* recombinante pode aumentar o nível de movimentação dentária induzida por aplicação de força mecânica. De acordo com os achados desse estudo, observa-se que a expressão de *VEGF* é estimulada por aplicação de força mecânica. Sugere-se que essa proteína influencia no recrutamento de células elásticas, pois se sabe que além de ser um dos principais fatores envolvidos no processo angiogênico, o *VEGF* também propicia o aumento da permeabilidade vascular (KAKU et al., 2001). O *VEGF*, confirmando o que já foi relatado anteriormente, tem a capacidade de induzir a função osteoclástica, assim como a

neovascularização. Os resultados da presente pesquisa confirmam relatos publicados anteriormente Kohno et al., (2003) que também sugerem que o *VEGF* aumenta expressivamente, após estímulo mecânico, o número de osteoclastos como um fator parácrino e que a movimentação ortodôntica é acelerada tanto pelo *VEGF* endógeno quanto pelo *VEGF* recombinante. A utilização dessa proteína poderá futuramente ser muito útil na clínica ortodôntica.

Os níveis aparentemente aumentados de *VEGF* encontrados na presente pesquisa podem ser explicados principalmente pela remodelação do tecido sutural, sendo que esta reação envolve basicamente o tecido conjuntivo da sutura e osso adjacente. Uma segunda possibilidade é que as ações desempenhadas pelo *VEGF* estão ligadas mais diretamente aos processos de neovascularização do tecido de inserção, pois o *VEGF* é um peptídeo que desempenha papel muito específico na angiogênese. O laser de baixa potência foi mais eficiente quando aplicado por três dias seguidos, onde observou-se que todos os períodos mostraram uma expressão maior do *VEGF* quando comparado com apenas uma irradiação.

Atualmente estudos *in vitro* e *in vivo* em camundongos osteoporóticos (op/op) tem demonstrado que o *VEGF* regula a expressão do *RANK* na superfície dos precursores de osteoclastos (NIIDA et al., 1999). Porém, a sinalização do *RANK-L* estimula os osteoclastos e seus precursores a liberarem a isoforma *VEGF-C*, indicando que o *VEGF-C* é um gene alvo do *RANK-L* nos osteoclastos, funcionando como um fator autócrino para o controle da atividade osteoclástica (ZHANG et al., 2008).

No presente estudo a vascularização foi substancial em todos os períodos, sendo que nos períodos iniciais esteve associada à remoção do coágulo e mais tarde à reabsorção e a formação óssea. Até o período de sete dias a superfície óssea sutural mostrou histologicamente, áreas de reabsorção com grande número de lacunas de Howship e, inclusive, presença de osteoclastos multinucleados ativos, com citoplasma abundante, dispostos em cadeia a esta superfície, isolados ou em pequenos grupos caracterizando intensa atividade de absorção óssea frontal, deixando a superfície óssea irregular, recortada, com várias lacunas de Howship distribuídas em sua extensão. Neste período observou-se uma maior expressão de *VEGF* tanto no grupo irradiado quanto no não-irradiado. Até o período de 10 dias, a neovascularização, observada histologicamente, exibiu o mesmo padrão de

formação estando associada, principalmente, a formação do tecido conjuntivo, com invasão do coágulo sanguíneo a partir dos vasos preexistentes localizados nos tecidos adjacentes ao defeito ósseo e subsequente formação do tecido de granulação, um tecido conjuntivo frouxo, ricamente celularizado e vascularizado. Aos 10 dias, embora o tecido conjuntivo diminuísse pela sua substituição por tecido ósseo, nas bordas da sutura, o percentual de vasos no tecido conjuntivo manteve-se constante.

O elevado índice de expressão do *VEGF* no Grupo Experimental I em relação ao Grupo Experimental II pode ser observado e quantificado pela análise do RT-PCR e pela análise das bandas protéicas obtidas por western blotting. Diferencialmente, das outras proteínas, a expressão inicial do *VEGF* foi observada em áreas que foram invadidas pelo coágulo sanguíneo reabsorvido por células macrofágicas. A presença do *VEGF*, detectada pelo western blotting, imediatamente após a ERM, estava relacionada ao coágulo sanguíneo como observado por Street et al.,2002. Estas áreas também estavam associadas às áreas de reabsorção e neoformação óssea, demonstrando a importante participação do *VEGF* na vascularização óssea, diferenciação dos condrócitos, osteoblastos, células endoteliais e osteoclastos e na formação do tecido medular.

Na análise utilizando o western blotting, observou-se que a expressão da proteína *VEGF* apresentou diferença estatisticamente significativa entre o grupo com uma e três aplicações de laser em todos os períodos. No Grupo Exp III mostrou-se mais expresso quando comparado com o Exp II. No Grupo Exp II houve uma tendência para menor expressão da proteína *VEGF* e isto nos leva a crer que nos outros períodos alguns fatores podem ter sido compensados por outros mediadores químicos ou células, pois se a PGE_2 aumenta a expressão de *VEGF*, espera-se que nos animais tratados com laser o *VEGF* seja menos expresso em todos os períodos, e foi o que foi observado na presente pesquisa.

No período final de observação (10 dias) houve diferença estatisticamente significativa para o Grupo Exp I e III quando comparado com o controle. Sugere-se que neste período o organismo consiga frear a destruição tecidual, bloqueando o processo inflamatório, sugerindo um quadro de tendência a normalidade.

Na tentativa de promover maior conforto ao paciente, as ciências da saúde vêm se preocupando constantemente com o desenvolvimento de mecanismos e

técnicas capazes de minimizar os sinais clássicos da inflamação, como dor e edema. O efeito da laserterapia tem sido um assunto vastamente investigado nos últimos anos e é de alto interesse na área da Odontologia. Desta forma, o presente estudo avaliou a influência do LBP sobre o início do processo de reparo ósseo, em ratos, tanto histologicamente quanto em relação à expressão de genes de relevância nesse processo. A análise histológica deste trabalho confirma achados prévios (PINHEIRO et al., 2003; PINHEIRO & GERBI 2006; KHADRA et al., 2004a; KHADRA et al., 2004b) mostrando que o LBP pode influenciar positivamente a reparação óssea.

A expressão gênica e os efeitos de *RANK-L* (fator pró-reabsorção) e *OPG* (fator anti-reabsorção) no remodelamento ósseo têm sido demonstrados *in vivo* e *in vitro*. No presente estudo a análise da expressão do RNAm do *RANK-L* e *OPG* demonstra que o LBP favoreceu a resposta de reabsorção óssea, pois a análise intragrupo demonstrou que no grupo Exp I houve um aumento abrupto no período de 24 horas, sendo que o nível de *RANK-L* permaneceu aumentado neste grupo até sete dias ($p < 0,01$). O mesmo aconteceu com a *OPG*, porém não foi significativo. Quando se analisou o Grupo Exp II e Exp III, que foram irradiados o aumento do *RANK-L* foi significativo, até os sete dias, e da *OPG* a partir deste momento. Isto demonstra que o período de reabsorção óssea predominou durante o início do experimento e a partir de 10 dias houve predomínio de formação óssea. A análise intergrupo demonstrou diferença estatisticamente significativa nos períodos de 2 e 3 dias para o *RANK-L* ($p < 0,001$) e 1, 3, 7 e 10 dias para a *OPG* ($p < 0,001$).

Como visto neste estudo, o LBP pode promover a modulação de genes envolvidos no processo de homeostasia óssea. Por meio da análise dos resultados do presente estudo, pôde-se observar que a laserterapia afetou o padrão de expressão para os genes *RANK*, *RANK-L*, *OPG* e *VEGF*. Portanto, a irradiação com o LBP teve importância durante a diferenciação e o comprometimento osteoblástico e levou a uma forte resposta osteogênica, mas o seu papel é mais importante durante o processo no início do processo.

Considerações finais e Implicações clínicas

Os reflexos da evolução dos conhecimentos genéticos têm sido profundamente sentidos em todas as especialidades odontológicas. De fato, nenhum profissional da saúde, que pretenda exercer suas funções de forma consciente e responsável, pode estar à parte da revolução genética ocorrida nas últimas décadas. A barreira que divide a ciência básica da ciência aplicada, a qual sempre foi tênue, está agora a ponto de desaparecer. Cada vez mais os clínicos necessitarão acompanhar as novas informações científicas. Porém, comparações pertinentes entre os resultados obtidos neste trabalho em relação a outros presentes na literatura devem ser conduzidas com cautela devido à escassez de estudos sobre este assunto. É importante ressaltar que este trabalho é único apesar da existência de alguns semelhantes. Mesmo diante desta dificuldade, torna-se difícil estabelecer parâmetros e avaliar o estudo realizado.

Com base nos resultados desta pesquisa, propomos a realização de futuros trabalhos utilizando este modelo de estudo. Sabemos que a procura por soluções e materiais ideais para qualquer área de conhecimento dentro da Odontologia, atualmente, deve estar direcionada ao conhecimento de proteínas expressas pelo nosso próprio organismo às quais, com o auxílio dos princípios de biologia molecular e terapia genética poderão vir a serem investigadas para que, desse modo, os resultados laboratoriais possam ser transportados para a clínica odontológica.

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

Respeitadas as características do presente estudo, a análise conjunta dos resultados obtidos neste trabalho, com a utilização de diferentes técnicas, permitiu sugerir que:

1. Foi observado um aumento da expressão de RNAm de todas as proteínas pesquisadas (*RANK*, *RANK-L*, *OPG* e *VEGF*) após a aplicação da ERM, demonstrando que essas proteínas se relacionam aos eventos de remodelação do tecido sutural e ósseo.

2. Histologicamente observou-se que o grupo que foi irradiado após a ERM mostrou uma aceleração do processo de reparo ósseo quando comparado ao grupo que só recebeu a ERM.

3. Quando se comparou o grupo que recebeu uma irradiação com o que recebeu 3 irradiações, observou-se que no grupo Exp III um aumento da *OPG* nos períodos finais e do *RANK-L* nos períodos iniciais do experimento.

8. Referências

8.REFERÊNCIAS

- Aai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation during Fracture Healing and Distraction. *J Dent Res.* 87(2): 107-18, Feb 2008.
- Ajubi NE, Klein-Nulend J, Nijweide PJ, Vrijheid-Lammers T, Alblas MJ, Burger EH. Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes--a cytoskeleton-dependent process. *Biochem Biophys Res Commun.* 225(1):62-8, Aug 1996.
- Angeletti P, Pereira Md, Gomes Hc, Hino Ct, Ferreira Lm. Effect of low-level laser therapy (GaAlAs) on bone regeneration in midpalatal anterior suture after surgically assisted rapid maxillary expansion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 109(3):e38-46, Mar 2010.
- Artese L, Rubini C, Ferrero G, Fioroni M, Santinelli A, Piattelli A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in healthy and inflamed human dental pulps. *J Endod.* 28(1):20-3, Jan 2002.
- Blenman PR, Carter DR, Beaupre GS. Role of mechanical loading in the progressive ossification of a fracture callus. *J Orthop Res.* 7(3):398-407, 1989.
- Booth V, Young S, Cruchley A, Taichman NS, Paleolog E. Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. *J Periodontal Res.* 33(8):491-9, Nov 1998.
- Botero TM, Mantellini MG, Song W, Hanks CT, Nor JE. Effect of lipopolysaccharides on vascular endothelial growth factor expression in mouse pulp cells and macrophages. *Eur J Oral Sci.* 111(3):228-34, Jun 2003.
- Brighton CT, Fisher JR, Jr., Levine SE, Corsetti JR, Reilly T, Landsman AS, et al., The biochemical pathway mediating the proliferative response of bone cells to a mechanical stimulus. *J Bone Joint Surg Am.* 78(9):1337-47, Sep 1996.
- Brugnera Junior, A. et al. Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica. São Paulo: Santos, 2003.
- Brugnera, A.J.; Pinheiro, A.L.B. Lasers na Odontologia Moderna. 1. ed. São Paulo: Pancast. 1998.
- Bustin, S.A., Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 25(2):169-193, 2000.
- Campbell JT, Kaplan FS. The role of morphogens in endochondral ossification. *Calcif Tissue Int.* 50(3):283-9, Mar 1992.
- Cowin SC. On mechanosensation in bone under microgravity. *Bone.* 22(5 Suppl):119S-25S, May 1998.
- Cowin SC, Weinbaum S. Strain amplification in the bone mechanosensory system. *Am J Med Sci.* 316(3):184-8, Sep 1998.

Cowin SC. The significance of bone microstructure in mechanotransduction. *J Biomech.* 40 (Suppl 1):S105-S109, 2007.

Ferguson CM, Miclau T, Hu D, Alpern E, Helms JA. Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair. *Ann N Y Acad Sci.* 23(857):33-42, Oct 1998.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer.* 32A(14):2413-22, Dec 1996.

Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med.* 5(12):1359-64, Dec 1999.

Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol.* 11(6):617-24, Dec 2000.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 9(6):669-76, Jun 2003.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 25(4):581-611, Aug 2004.

Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science.* 235(4787):442-7, Jan 1987.

Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 5;267(16):10931-4, Jun 1992.

Francis-West P, Tickle C. Limb development. *Curr Top Microbiol Immunol.* 212:239-59, 1996.

Garant PR. Oral Cells and Tissues. Illinois: Quintessence Books; 2003.

Giordano V, Giordano M, Knackfuss IG. Fatores de crescimento e diferenciação ósseos. Efeitos sobre o processo de consolidação de fratura: presente e futuro. *Rev Bras Med.* 57(9):14-20, 2000.

Giordano V, Giordano M, Knackfuss IG, Apfel MI, Gomes RD. Effect of tenoxicam on fracture healing in rat tibiae. *Injury.* 34(2):85-94, Feb 2003.

Goodis H, Saeki K. Identification of bradykinin, substance P, and neurokinin A in human dental pulp. *J Endod.* 23(4):201-4, Apr 1997.

Gounis MJ, Spiga MG, Graham RM, Wilson A, Haliko S, Lieber BB, et al., Angiogenesis is confined to the transient period of VEGF expression that follows adenoviral gene delivery to ischemic muscle. *Gene Ther.* 12(9):762-71, May 2005.

Hall G, Anneroth G, Schennings T, Zetterqvist L, Ryden H. Effect of low level energy laser irradiation on wound healing. An experimental study in rats. *Swed Dent J.* 18(1-2):29-34, 1994.

Harik SI, Hritz MA, LaManna JC. Hypoxia-induced brain angiogenesis in the adult rat. *J Physiol.* 485 (Pt 2):525-30, Jun 1995.

Hernández-Gil F-T, Gracia A MA, Pingarrón MC, Jerez BL. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 11:E47-51, 2006.

- Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol.* 23(5):1011-27, Feb 2005.
- Hill PA. Bone remodelling. *Br J Orthod.* 25(2):101-7, May 1998.
- Imhof BA, Dunon D. Basic mechanism of leukocyte migration. *Horm Metab Res.* 29(12):614-21, Dec1997.
- In de Braekt MM, van Alphen FA, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC. Effect of low level laser therapy on wound healing after palatal surgery in beagle dogs. *Lasers Surg Med.* 11(5):462-70, 1991.
- Kaku M, Kohno S, Kawata T, Fujita I, Tokimasa C, Tsutsui K, et al., Effects of vascular endothelial growth factor on osteoclast induction during tooth movement in mice. *J Dent Res.* 80(10):1880-3, Oct 2001.
- Karu, T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.*, 56 (5):691-704, 1989.
- Katsube K, Bishop AT, Simari RD, Yla-Herttuala S, Friedrich PF. Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transfer enhances surgical revascularization of necrotic bone. *J Orthop Res.* 23(2):469-74, Mar 2005.
- Kawasaki K, Shimizu N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers Surg Med.* 26(3):282-9, 2000.
- Kidd LJ, Stephens AS, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Wu AC, Forwood MR. Temporal pattern of gene expression and histology of stress fracture healing. *Bone.* 46(2):369-78, Feb 2010.
- Kohno S, Kaku M, Tsutsui K, Motokawa M, Ohtani J, Tenjo K, et al., Expression of vascular endothelial growth factor and the effects on bone remodeling during experimental tooth movement. *J Dent Res.* 82(3):177-82, Mar 2003.
- Koransky ML, Robbins RC, Blau HM. VEGF gene delivery for treatment of ischemic cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 12(3):108-14, Apr 2002.
- Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod.* 28(3):221-40, Jun 2006.
- Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg.* 122(4):532-5, Oct 1971.
- Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med.* 5(1):31-9, 1985.
- Nagasawa A, Kato K, Negisbi A. Bone regeneration effect of low level lasers including argon laser. *Laser Therapy.* 3:59-62, 1991.
- Niida S, Kaku M, Amano H, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S, et al., Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med.* 190(2):293-8, Jul 1999.
- Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A, Binderman I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. *J Oral Rehabil.* 33(8):619-924, Aug 2006.

Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16:191-220, 2000.

Orikasa N, Shimakura M, Kusakari H. Effects of Al-Ga-As laser in bone histomorphometry. In: Yamamoto H, Atsumi K, Kusakari H, editors. *Lasers in dentistry*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1989:105-9.

Osawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-power laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone.* 22(4):347-54, Apr 1998.

Owan I, Burr DB, Turner CH, Qiu J, Tu Y, Onyia JE, et al. Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *Am J Physiol.* 273(3 Pt 1):C810-C815, Sep 1997.

Parfitt AM. Life history of osteocytes: relationship to bone age, bone remodeling, and bone fragility. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2(6):499-500, Dec 2002.

Parfitt AM. Size of bone in the aged endocortical resorption. *J Bone Miner Res.* 17(7):1306-8, Jul 2002.

Parfitt AM. Misconceptions (2): turnover is always higher in cancellous than in cortical bone. *Bone.* 30(6):807-9, Jun 2002.

Parfitt AM. What is the normal rate of bone remodeling? *Bone.* 35(1):1-3, Jul 2004.

Pe'er J, Shweiki D, Itin A, Hemo I, Gnessin H, Keshet E. Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. *Lab Invest.* 72(6):638-45, Jun 1995.

Pinheiro AL, Cavalcanti ET, Pinheiro TI, Alves MJ, Miranda ER, De Quevedo AS, et al., Low-level laser therapy is an important tool to treat disorders of the maxillofacial region. *J Clin Laser Med Surg.* 16(4):223-6, Aug 1998.

Pinheiro AL, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg.* 24(2):169-78 Apr 2006.

Polverini PJ. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *J Dent Educ.* 66(8):962-75, Aug 2002.

Proffit WR, Fields HW. *Contemporary Orthodontics*. St. Louis: Mosby; 2007.

Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.* 8:455-98, 2006.

Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 111(5):525-32, May 1997.

Sawada M, Shimizu N. Stimulation of bone formation in the expanding mid-palatal suture by transforming growth factor-beta 1 in the rat. *Eur J Orthod.* 18(2):169-79, Apr 1996.

- Seifi, M., Shafeei, H.A., Daneshdoost, S., & Mir, M. 2007. Effects of two types of low-level laser wave lengths (850 and 630 nm) on the orthodontic tooth movements in rabbits. *Lasers Med.Sci.*, 22, (4) 261-264, Nov 2007.
- Silva I, Branco JC. Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta Reumatol Port.* 36(3):209-18, Jul-Sep 2011.
- Spector JA, Luchs JS, Mehrara BJ, Greenwald JA, Smith LP, Longaker MT. Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. *Plast Reconstr Surg.*107(1):124-34, Jan 2001.
- Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 9(4):498-521, 1998.
- Takeda Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction: experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 17:388-91, 1988.
- Teitelbaum SL & Ross FP, Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet.* 4(8):638-49, Aug 2003.
- Trelles MA, Mayayo E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Lasers Surg Med.* 7(1):36-45, 1987.
- Ueda Y, Shimizu N. Pulse irradiation of low-power laser stimulates bone nodule formation. *J Oral Sci.* 43(1):55-60, Mar 2001.
- Ueda Y, Shimizu N. Effects of pulse frequency of low-level laser therapy (LLLT) on bone nodule formation in rat calvarial cells. *J Clin Laser Med Surg.* 21(5):271-7, Oct 2003.
- Villars F, Bordenave L, Bareille R, Amedee J. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? *J Cell Biochem.* 79(4):672-85, Sep 2000.
- Villars F, Guillotin B, Amedee T, Dutoya S, Bordenave L, Bareille R, et al.,Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282(4):C775-C785, Apr 2002.
- Weber JB, Pinheiro AL, De Oliveira MG, Oliveira FA, Ramalho LM. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologus bone graft. *Photomedicine and Laser Surg.* 24(1):38-44, 2006.
- Wlodarski KH. Properties and origin of osteoblasts. *Clin Orthop Relat Res.* (252):276-93, Mar 1990.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 407(6801):242-8, Sep 2000.
- Zhang Q, Guo R, Lu Y, Zhao L, Zhou Q, Schwarz EM, et al.,VEGF-C, a lymphatic growth factor, is a RANKL target gene in osteoclasts that enhances osteoclastic bone resorption through an autocrine mechanism. *J Biol Chem.* 283(19):13491-9, May 2008.

9. Anexo