

GABRIELA DE FÁTIMA SANTANA MELO

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA REMODELAÇÃO
ÓSSEA ALVEOLAR EM RATOS DIABÉTICOS DURANTE A
MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA ASSOCIADA À
LASERTERAPIA**



2012

GABRIELA DE FÁTIMA SANTANA MELO

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA REMODELAÇÃO ÓSSEA
ALVEOLAR EM RATOS DIABÉTICOS DURANTE A MOVIMENTAÇÃO
ORTODÔNTICA ASSOCIADA À LASERTERAPIA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientador: Profa. Adj. Mônica Fernandes Gomes

São José dos Campos

2012

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

M492a Melo, Gabriela de Fátima Santana

Avaliação imuno-histoquímica da remodelação óssea alveolar em ratos diabéticos durante a movimentação ortodôntica associada à laserterapia / Gabriela de Fátima Santana Melo. - São José dos Campos : [s.n.], 2012.
101 .f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2012.
Orientador: Profa. Dra. . Mônica Fernandes Gomes.

1. Imuno-histoquímica. 2. Laserterapia. 3. Ortodontia. 4. Diabetes mellitus. 5. RANK-L. 6. OPG. I. Gomes, Mônica Fernandes. II. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". IV. UNESP – Univ Estadual Paulista. V. Título

tD4

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 24 de Setembro de 2012 .

Assinatura :

E-mail: gabrieladsantana@yahoo.com.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Mônica Fernandes Gomes (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP - Univ Estadual Paulista

Profa. Dra. Maria das Graças Vilella Goulart

PFOPD – Programa de Formação Odontológica em Pacientes Especiais

Secretaria do Estadual de Pessoas com Deficiência

São José dos Campos, 19 de Julho de 2012

DEDICATÓRIA

À Deus, por ser o esteio maior da minha vida, ajudando-me a enfrentar todas as tarefas da minha existência, inclusive esta.

À minha mãe Nelza Campos, pelo carinho e dedicação, sem seu apoio e incentivo nada teria sentido. Não há palavras suficientes para agradecer por tudo de bom que fez e ainda faz por mim, minha eterna gratidão e amor.

Ao meu marido Daniel Melo, pelo carinho, paciência, dedicação e apoio incondicional. Tê-lo ao meu lado tornou minha caminhada mais suave e me deu forças para seguir em frente.

Aos meus irmãos, Andréia e Alex, pelo carinho e alegria mesmo nos momentos mais difíceis e fatigantes.

Amo vocês!!!!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli e do vice-diretor Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpura.

À Prof. Adj. Mônica Fernandes Gomes, da disciplina de Patologia Bucal de Faculdade de Odontologia da Unesp de São José dos Campos, minha orientadora, por ter me aberto às portas do mundo científico, me convidado a entrar e dividido comigo, um pouco de seu amplo conhecimento. Muito obrigada por tudo que aprendi e a confiança em mim depositada.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Adj. Cristiane Koga Ito.

Aos docentes do Programa de Biopatologia Bucal, pela colaboração e ensinamentos transmitidos. Em especial à Profa. Tit. Yasmín Rodarte Carvalho por todo o incentivo e disposição em ajudar e ensinar e à Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito, pela dedicação, pela amizade e pela paciência sempre.

Aos professores da Disciplina de histologia, Prof. Miguel Castillo Angel Salgado, Profa. Dra. Luana M. R. de Vasconcellos, Profa. Dra. Marianne Spalding, Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito e ao amigo Walter Cruz, pelo acolhimento, ensinamento e pelo exemplo de profissionais que são.

À Prof. Dra. Maria das Graças Vilella Goulart, pesquisadora do CEBAPE/ Unesp, pela ajuda inestimável nesta pesquisa nos momentos de maiores dificuldades.

As minhas amigas Cybelle Hiraoka, Gabriela de Moraes Gouvêa Lima, Fernanda Maria de Brito Cunha, Miriane Salgado, Pamela Aparecida Diniz, Maria Alcioneia Carvalho, Valéria Adriano Vieira, Luana Martins Galvão, Edmundo Silva, Mônica Ghislaine Oliveira Alves, Miriam

Yumí Matsui e Michelíne Gutterres muito obrigada pela dedicação, atenção, e paciência em todos os momentos, que certamente foram essenciais para a conclusão deste trabalho. Certamente as horas de convívio, as risadas, os problemas compartilhados, foram eternizados e solidificados para que dessem origem a uma das coisas, mais preciosas desta vida que se chama AMIZADE.

Aos amigos da microbiologia, Maria Alcionéia Carvalho, Aline Borges, Jorgiana Sangalli, Fernanda L. Brighenti, Daniel Freitas, Guilherme Teodoro e Bruno Mello de Matos obrigada pelo convívio, risadas, problemas compartilhados e amizade tornando a caminhada mais suave.

À amiga Tábata de Mello Tera, pela disponibilidade, paciência e pela ajuda inestimável, o mundo científico precisa de pessoas como você, compartilhar o conhecimento é uma sabedoria.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação, pelos bons momentos, conversas e aprendizados.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, Rosemary De Fátima Salgado, Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka e Erena Michie Hasegawa, meu reconhecimento pelo desenvolvimento de seus trabalhos e preocupação em todas as atividades, a ajuda de vocês foi essencial.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia da Unesp de São José dos Campos, Lourival Jacobs, Antonio Sávio Barbosa Maia Vasconcelos e Marco Antônio Corrêa Alfredo pela amizade e ajuda com os animais na fase experimental deste trabalho.

Aos funcionários da FOSJC-UNESP, que sempre me ajudaram a superar os obstáculos do cotidiano.

Aos animais experimentais, seres cujas vidas foram sacrificadas em benefício e progresso da ciência.

À CAPES pela concessão de bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho sob o processo n° 2010/50500-1.

Obrigada a todos pela ajuda nessa caminhada, por dividirem o dia-a-dia nesses dois anos e por tornarem as coisas mais fáceis.

À todos, muito obrigada!!!!

*“Sei que meu trabalho é uma gota no oceano,
mas sem ele, o oceano seria menor.”*

Madre Tereza de Calcutá

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Diabetes melittus	19
2.2 Movimentação Ortodôntica	22
2.3 Laserterapia	25
2.3.1 Mecanismo de Ação do Laser de Baixa Potência	26
2.3.2 Aplicação da Laserterapia	27
2.4 Sistema RANK/RANKL/OPG	30
3 PROPOSIÇÃO	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Animais	35
4.2 Grupos Experimentais	36
4.3 Procedimentos Clínicos	36
4.3.1 Anestesia	36
4.3.2 Indução do Diabetes	37
4.3.3 Mensuração da Glicemia	38
4.3.4 Instalação do Dispositivo Ortodôntico	39
4.3.5 Laserterapia	40
4.3.6 Eutanásia	41
4.4 Processamento Histológico	41
4.5. Análise Histomorfológica	42
4.6 Análise Imuno-histoquímica	43
4.7 Análise Histomorfométrica	45

4.8 Análise Estatística	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Análise Histomorfológica.....	48
5.1.1 Período de 7 dias.....	48
5.1.1.1 Grupo Controle	48
5.1.1.2 Grupo Laser	50
5.1.1.3 Grupo Diabetes.....	52
5.1.1.4 Grupo Diabetes-Laser.....	53
5.1.2 Período de 14 dias.....	55
5.1.2.1 Grupo Controle	55
5.1.2.2 Grupo Laser	56
5.1.2.3 Grupo Diabetes.....	58
5.1.2.4 Grupo Diabetes-Laser.....	60
5.1.3 Período de 21 dias.....	61
5.1.3.1 Grupo Controle	61
5.1.3.2 Grupo Laser	63
5.1.3.3 Grupo Diabetes.....	64
5.1.3.4 Grupo Diabetes-Laser.....	65
5.2 Análise Imuno-histoquímica	67
5.3 Análise Histomorfométrica	68
6 DISCUSSÃO.....	72
7 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS	82
ANEXO A	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP = Difosfato de Adenosina

AsGaAl = Arseneto de Gálio e Alumínio

ATP = Trifosfato de Adenosina

BSA = Albumina Bovina

C = Grupo Controle

cm = Centímetro

L = Grupo Laser 20 J/cm²

cN = centiNewton

D = Grupo Diabético

DAB = Diaminobenzidina

D-L = Grupo Diabético Laser 20 J/cm²

DHCC = Dihidroxicalciferol

DM = Diabetes Mellitus

Gr = Grama

H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio

IM = Intramuscular

J = Joules

J/cm² = Joules por centímetro quadrado

Kg = Kilograma

L = Litro

LASER = Light Ampliation by Stimulated Emission of Radiation

M-CSF = Fator Estimulante de Colônia de Macrófago

mg = Miligrama

mg/dl = Miligrama por decilitro

mL = Mililitro

mol/L = Mol por Litro

nm = Nanômetro

mw = MiliWatts

NaCl = Cloreto de Sódio

N = Newton

NiTi = Níquel-Titânio

OMS = Organização Mundial de Saúde

OPG = Osteoprotegerina

RANK-L = Ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa- β

μm = Micrômetro

Santana-Melo GF. Avaliação imuno-histoquímica da remodelação óssea alveolar em ratos diabéticos durante a movimentação ortodôntica associada à laserterapia [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2012.

RESUMO

O Diabetes mellitus é um distúrbio metabólico crônico e sua prevalência vem aumentando de forma exponencial, particularmente nos países em desenvolvimento. Concomitantemente tem aumentado a acessibilidade ao tratamento ortodôntico, incluindo pacientes diabéticos, tornando o processo de remodelação óssea frente aos estímulos ortodônticos motivo de grande preocupação. A procura por meios que possam melhorar esse processo é uma realidade atual, a aplicação do laser de baixa potência durante a movimentação ortodôntica pode ser de grande valia, principalmente com o descontrole glicêmico. Desta forma o objetivo deste trabalho foi analisar por meio de reações imuno-histoquímicas, o processo de remodelação óssea alveolar, decorrente do movimento ortodôntico em ratos diabéticos e a influência da aplicação do laser de baixa potência AsGaAl durante o período experimental de 7, 14 e 21 dias. Foram utilizados 60 ratos machos *Wistar*, divididos em 4 grupos por período: Grupo Controle (C), Grupo Laser (L), Grupo Diabetes (D) e Grupo Diabetes-Laser (D-L). Para a indução do diabetes foi utilizada uma dose única de aloxano (40mg/kg), a glicemia foi mensurada e sendo os ratos considerados diabéticos foram submetidos a uma força ortodôntica de 20cN, assim como todos os animais dos grupos (C) e (L). Os grupos (L) e (D-L) foram tratados com laser de baixa potência AsGaAl em dias intercalados até a eutanásia. Foram realizadas análises histomorfológicas, reação imuno-histoquímica e histomorfometria para os anticorpos RANK-L e OPG do primeiro molar inferior direito, submetido à movimentação ortodôntica. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente mediante os testes de variância (ANOVA) e TUKEY ($P < 0,05$). Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que houve efetividade da radiação laser AsGaAl durante a movimentação ortodôntica, visto que, a fisiopatologia do diabetes não interferiu na integridade dos tecidos periodontais e no processo de remodelação óssea alveolar.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica. Laserterapia. Ortodontia. Diabetes Mellitus. RANK-L. OPG.

Santana-Melo GF. *Immunohistochemical evaluation of alveolar bone remodeling in diabetic rats during orthodontic movement associated with laser therapy [dissertation].* São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2012.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disorder and its prevalence has been increasing exponentially, particularly in developing countries. At the same time the accessibility to orthodontic treatment has increased, including diabetic patients, making the point of process of bone remodeling in the face of orthodontic stimuli of great concern. The search for ways they can improve this process is a current reality, the application of low power laser during orthodontic movement can be of great value, especially with the loss of glycemic control. Thus, the objective of this study was to analyze by immunohistochemical reactions, the process of alveolar bone remodeling, due to orthodontic movement in diabetic rats and the influence of application of low power laser GaAlAs during the experimental period of 7, 14 and 21 days. Sixty male Wistar rats were divided into four groups: Control (C), Laser Group (L), Diabetes Group (D) and Diabetes Group-Laser (DL). For the induction of diabetes a single dose of alloxan (40mg/kg) was used, considered diabetic by blood glucose measure nurts and the molar was subjected to a force orthodontic 20cN as well as all the animals of group (C) and (L .) Groups (L) and (DL) were treated with low power GaAlAs laser every other day until euthanasia. Analyzes were performed by histomorphology, immunohistochemistry and histomorphometry for antibodies RANK-L and OPG in the mesial and distal and mesial interradicular septum of the interdental septum of the alveolar bone of the lower right first molar, subjected to orthodontic movement. The data were statistically analyzed by means of tests of variance (ANOVA) and Tukey is tests ($P < 0.05$). Based on these results, it can be concluded that there was effectiveness of GaAlAs laser radiation during orthodontic movement, since the pathophysiology of diabetes did not affect the integrity of the periodontal tissues and alveolar bone remodeling process.

Keywords: Immunohistochemistry. Laser therapy. Orthodontics. Diabetes Mellitus. RANK-L. OPG.

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes mellitus (DM) é um distúrbio crônico do metabolismo dos carboidratos, cuja característica principal é a hiperglicemia (Robbins et al., 2000; Dall Agnol et al., 2009). Estima-se que cerca de 12% da população brasileira é diabética, tornando-a uma das doenças não-contagiosas mais comuns (Maraschin et al., 2010). Sua incidência vem aumentando de modo alarmante nos países em desenvolvimento, tanto em adultos quanto em crianças e adolescentes, e estima-se um aumento de 60% da prevalência na população adulta acima de 30 anos em 2025, atingindo maior magnitude na faixa dos 45 aos 64 anos de idade (Maraschin et al., 2010; OMS 2012). Os principais sintomas da doença não controlada são polidipsia, polifagia, poliúria e perda de peso. A gravidade e cronicidade da hiperglicemia podem provocar complicações clássicas como a microangiopatia, retinopatia, neuropatia, nefropatia, doenças macrovasculares, retardo na cicatrização de feridas e periodontopatias (Carboni, 2000; Rodrigues et al., 2010).

Os tipos mais comuns de diabetes são Tipo 1 e Tipo 2. O Tipo 1 resulta primariamente da destruição das células beta pancreáticas, com tendência à cetoacidose e o Tipo 2 resulta de graus variáveis de resistência à insulina ou da deficiência relativa de secreção de insulina (Rodrigues et al., 2010). As doenças vasculares nos diabéticos afetam pequenos e grandes vasos, mas em sua maioria afeta vênulas, arteríolas e capilares de vários órgãos e tecidos, incluindo as estruturas bucais e o suprimento de sangue no osso alveolar. Além dos problemas clássicos, no paciente diabético há alteração na velocidade de reabsorção e neoformação óssea, o que tem influencia direta no tratamento ortodôntico (Viera et al., 2006; Vila Real et al., 2009).

O aumento do número de indivíduos diabéticos indicados para tratamentos ortodôntico e/ou ortopédico tem ocorrido exigindo do odontólogo novos conhecimentos relacionados à fisiologia dos tecidos duros durante o processo de movimentação dentária induzida. A movimentação ortodôntica é regida por fatores biológicos e mecânicos, caracterizada por reações sequenciais do tecido periodontal em resposta às forças aplicadas e depende da capacidade das células periodontais em responderem a estes estímulos mecânicos, os quais geram alterações teciduais que culminam na reabsorção do tecido ósseo no lado de pressão e aposição no lado de tensão resultando na remodelação óssea alveolar (Mermut et al., 2007; Silveira, 2006). A remodelação óssea é um processo dinâmico que necessita de atividades celulares coordenadas entre osteoblastos, osteócitos e osteoclastos para que se mantenha a homeostasia do tecido mineral (Stains, Civitelli, 2005; Alves et al., 2007).

A procura por meios que possam promover a movimentação ortodôntica e melhorar o processo de regeneração óssea é uma realidade atual. Destarte, a laserterapia tem sido muito utilizada nas áreas da Medicina e da Odontologia. O tipo mais usado nos tratamentos clínicos odontológicos é o laser em baixa potência AsGaAl, pois tem ação analgésica, antiinflamatória e bioestimulante celular, contribuindo positivamente na regeneração dos tecidos (Sá et al., 2010). Sugere-se, que a aplicação do laser de baixa potência durante a movimentação ortodôntica pode promover resultados efetivos, principalmente, em casos de pacientes diabéticos descompensados, visto que, pode melhorar a microcirculação dos tecidos envolvidos e, conseqüentemente, acelerar o processo de regeneração dos tecidos periodontais (Walsh, 2003; Alves et al., 2007; Sá et al., 2010).

Desta forma este trabalho foi proposto com a finalidade de compreender melhor as questões pertinentes ao movimento ortodôntico em ratos diabéticos e a ação do laser de baixa potência no processo de

remodelação óssea alveolar, uma vez que há carência de estudos relacionados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diabetes Mellitus (DM)

Entre as doenças crônicas não transmissíveis, o Diabetes mellitus (DM) se destaca como importante causa de morbidade e mortalidade. O acelerado ritmo do processo de envelhecimento da população, a maior tendência ao sedentarismo e os inadequados hábitos alimentares, além de outras mudanças sócio-comportamentais, contribuem para os crescentes níveis de incidência e prevalência desta doença (Dall Agnol et al., 2009).

O DM é um distúrbio crônico do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas, cuja característica principal é a hiperglicemia (Robbins et al., 2000), resulta de uma insuficiência absoluta ou relativa de insulina causada pela ausência ou baixa produção pelo pâncreas, ou pela falta de resposta dos tecidos periféricos à insulina (Maraschin et al., 2010). A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica o DM como uma pandemia, sendo, portanto, um problema de saúde pública. Estima-se que sua prevalência é de aproximadamente 12% da população brasileira, tanto em homens quanto em mulheres, podendo aumentar 60% na população adulta acima de 30 anos, com maior magnitude na faixa dos 45 aos 64 anos, em 2025 (Maraschin et al., 2010).

Os principais sintomas da doença não controlada são polidipsia, polifagia, poliúria e perda de peso. Além das complicações metabólicas, os portadores desta patologia podem desenvolver

complicações vasculares, neurológicas e infecciosas (Sonis et al., 1985; Bensch et al., 2004).

O DM pode ser classificado em vários tipos clínicos, o gestacional, medicamentoso, devido a distúrbios genéticos entre outros, serão abordados neste estudo os tipos mais comuns, os Tipos 1 e 2. O DM tipo 1 é resultante da destruição das células β pancreáticas e caracteriza-se como uma doença autoimune específica devido à presença de anticorpos anti-células β pancreáticas, há um aparecimento abrupto dos sintomas, insulinopenia, dependência de insulina exógena, propensão à cetoacidose e está associado à complicações progressivas. O DM tipo 2 exibe graus variáveis de resistência e/ou deficiência da secreção de insulina, o paciente frequentemente apresenta discretos sintomas relacionados ao problema metabólico, tendo início insidioso após 35 anos de idade, podendo ou não ser dependente de insulina. Podem fazer uso da insulina exógena em casos de descontrole glicêmico caso a dieta e/ou a medicação via oral não resolvam o problema. Os pacientes com diabetes tipo 2 geralmente são pacientes obesos ou com sobrepeso, podem ter níveis normais de produção de insulina, e normalmente apresentam resistência à insulina produzida (Reinehr et al., 2006; American Diabetes Association, 2009; Rodrigues et al., 2010).

O diagnóstico e a avaliação laboratorial são realizados mediante o exame de glicemia em jejum. O valor entre 99 a 126 mg/dL demonstra paciente pré-diabético e, acima de 126 mg/dL, o paciente é considerado portador de DM. Outros exames utilizados para diagnósticos do DM, em questão, são teste de tolerância à glicose, glicosúria, frutossamina e hemoglobina glicosilada, sendo, este último, o melhor método de controle para um intervalo de tempo médio de 3 meses (Ship, 2003; Alves et al., 2006).

Os portadores do DM podem sofrer complicações sistêmicas de ordem metabólica resultando em sintomas gastrointestinais, como náusea e vômito, instabilidade cardiovascular, desidratação,

alteração no estado mental, coma e morte (Vernillo et al., 2003; Alves et al., 2006). Outras consequências decorrentes do DM são alterações de vasos sanguíneos de pequenos e grandes calibres, que ocorrem devido à acentuada proliferação de células endoteliais aumentando a espessura da parede vascular, ocasionando obliteração e promovendo a diminuição do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, a diminuição da oxigenação celular, além de acúmulo de resíduos metabólicos, desenvolvendo a microangiopatia em todos os tecidos (Andersen et al., 2007). As consequências desses distúrbios vasculares são significativas complicações sistêmicas, tais como: aterosclerose coronariana, microangiopatias, retinopatia, nefropatia, neuropatias e severas infecções oportunistas (Vernillo et al., 2003; Ship, 2003; Bensch et al., 2004).

A insulina apresenta um importante papel na fisiobiologia do processo de reparação tecidual ao promover o ingresso da glicose nas células reduzindo a concentração de glicose sanguínea, esse processo promove a síntese de proteínas e o armazenamento de lipídios neutros, além de atuar como catalisador da biossíntese de ácido hialurônico (glicoproteína sintetizada pelos fibroblastos e osteoblastos), previamente ao colágeno. Na decorrência da diminuição da produção de insulina, a biossíntese de colágeno é retardada, refletindo na evolução lenta do processo de reparação tecidual em pacientes portadores de diabetes não compensados (Guyton, Hall, 1997; Melgaço, 2002; Madeiro et al., 2005).

Outra complicação do DM é a doença periodontal, sendo a manifestação bucal mais frequente nos indivíduos diabéticos (Lalla et al., 2000).

O mecanismo da destruição progressiva dos tecidos periodontais, ocorre devido ao aumento das atividades colagenolíticas nos tecidos, além da diminuição da síntese de colágeno, matriz óssea, quimiotaxia de neutrófilos, fatores de crescimento e matriz extracelular. Em adição, ocorre o aumento da apoptose, do stress oxidativo e desregulação das citocinas (Lalla et al., 2000). Além disso, a elevação da

secreção do fator de necrose tumoral e das citocinas interleucina 6 e prostaglandina E2, na doença periodontal, podem aumentar a resistência insulínica e dificultar o controle metabólico em pacientes portadores do diabetes (Nagasawa et al., 2010; Shankaracharya et al., 2012).

2.2 Movimentação Ortodôntica

Conhecer os fundamentos biológicos da movimentação dentária induzida facilita a compreensão das variáveis clínicas encontradas frente a mecânicas ortodônticas semelhantes. A biologia da movimentação dentária compreende o estudo dos fenômenos celulares, bioquímicos e moleculares que ocorrem no ligamento periodontal e do osso alveolar, nesta circunstância muito especial, que é o tratamento ortodôntico.

A movimentação ortodôntica é regida por fatores biológicos e mecânicos, caracterizada por reações sequenciais do tecido periodontal em resposta às forças aplicadas (Proffit et al., 2002). A movimentação ortodôntica depende da capacidade das células periodontais em responderem a estes estímulos mecânicos (Misawa-Kageyama et al., 2007), os quais geram alterações teciduais que, em conjunto com a ativação de mediadores químicos, como citocinas e prostaglandinas, sintetizadas e secretadas por células locais, resultam na remodelação óssea (Silveira, 2006; Mermut et al., 2007).

A remodelação óssea pode ser explicada pela teoria da pressão-tensão, na qual o processo de remodelação óssea é mais lento no lado de pressão do que no lado de tensão das fibras do ligamento periodontal. No lado de pressão, onde ocorre à compressão dos tecidos, as células do ligamento periodontal sofrem processo de degeneração, evoluindo para necrose com característica asséptica, exibindo aspecto

hialino. Além disso, ocorre desagregação das fibras colágenas do ligamento periodontal, alterações hemodinâmicas, aumento da vascularização e, conseqüentemente, infiltração de células inflamatórias, predominantemente, de neutrófilos nos tecidos. Simultaneamente, no lado de tensão, onde há estiramento das fibras do ligamento periodontal, ocorre aumento do número de fibroblastos e osteoblastos e, conseqüentemente, síntese de colágeno e matriz óssea, respectivamente, promovendo a neoformação óssea da parede adjacente ao dente tracionado (Ramalho, Bozzo, 1990; Santamaria et al., 2007; Henneman et al., 2008).

É importante salientar que estas alterações são reversíveis se a agressão não for de caráter patológico (Gibson et al. 1992; Ashizawa et al., 1998) e que não ocorre movimentação dentária em condições fisiopatológicas, enquanto as áreas hialinas não forem eliminadas (Verna et al., 2003; Miller et al., 2007; Henneman et al., 2008).

O processo inflamatório induzido ortodonticamente pode causar reabsorção radicular, a qual é considerada uma complicação comum no tratamento ortodôntico (Foo et al., 2007), mas esta, também, pode ser uma seqüela de doenças como inflamação periodontal (Gotz et al., 2006). Nos casos onde o movimento ortodôntico está ocorrendo pode-se afirmar que a reabsorção radicular acontece, geralmente, adjacente à zona de hialinização, devendo o profissional estar atento para este tipo de complicação (Harris, 2000; Gokce et al., 2008; Li Xin et al., 2010).

Vila Real et al., (2009) estudaram as modificações do ligamento periodontal de incisivos de ratos normoglicêmicos e diabéticos submetidos ou não à força ortodôntica. Vinte ratos machos foram utilizados e divididos em quatro grupos: animais normoglicêmicos não submetidos à movimentação dentária (C), animais normoglicêmicos submetidos à movimentação dentária (CAO), animais diabéticos não submetidos à movimentação dentária (D) e animais diabéticos submetidos à movimentação dentária (DAO). Os referidos animais permaneceram

com o dispositivo de movimentação dentária por 5 dias. Após a eutanásia, foram avaliados número de vasos sanguíneos e espessura do ligamento periodontal nas regiões dos terços cervical, médio e apical, mediante análise histológica. No lado de tensão, houve diferença significativa na espessura do ligamento periodontal nos ratos do grupo CAO ($p < 0,05$) em relação aos ratos do grupo C, nas regiões dos terços médio e cervical. Enquanto, os animais do grupo DAO ($p < 0,05$) apresentavam aumento estatisticamente significativo da espessura do ligamento periodontal quando comparada com os animais do grupo D, nas três regiões. O número de vasos sanguíneos, encontrados no ligamento periodontal, não apresentou diferença estatisticamente significativa quando todos os grupos foram comparados. Além disso, foram observadas lacunas de reabsorção óssea nos animais dos grupos CAO, D e DAO, mostrando as alterações no periodonto durante a MO.

Braga et al., (2011) investigaram os efeitos da condição do DM na movimentação ortodôntica. Sessenta camundongos machos foram utilizados e divididos em três grupos: normoglicêmicos, diabéticos e diabéticos tratados com insulina. Para indução do DM, foi administrado estreptozotocina, na dose de 120 mg/kg, por via intraperitoneal. Análise histomorfométrica e PCR quantitativo do periodonto foram realizadas. Neste estudo, foi constatado que os camundongos diabéticos mostravam maior movimentação ortodôntica e maior número de osteoclastos imunorreativos para TRAP do que os encontrados em camundongos normoglicêmicos ou tratados com insulina. Este achado estava relacionado com a expressão aumentada dos RANK-L, CSF1, CCL2, CCL5 e TNF α , envolvidos na atividade e recrutamento de osteoclastos e a expressão diminuída de marcadores osteoblásticos (Runx2, Ocn, Col1 e Alp) em camundongos diabéticos. Os camundongos diabéticos compensados devido ao tratamento com insulina resultou em achados histológicos semelhantes aos camundongos normoglicêmicos. Diante disso, os autores sugerem que a condição diabetes aumenta a migração

e atividade osteoclástica e diminui a diferenciação osteoblástica, resultando numa acentuada movimentação ortodôntica.

2.3 Laserterapia

O termo laser é um acrônimo da língua inglesa que significa Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, ou seja, Amplificação de luz por emissão estimulada de radiação. Atualmente, no que diz respeito à nomenclatura, o termo laserterapia é utilizado para laser de baixa potência (Tuner, Hode, 2007). Caracteriza-se pela unidirecionalidade, geração de feixe paralelo de radiação eletromagnética e comprimento de onda (λ) único, o qual produz fonte de luz monocromática, colimada e muito intensa (Karu, 1998; Walsh, 2003). A energia radiante do Laser possui um espectro de comprimento de onda visível aos olhos humanos, entre 385 e 760nm. Abaixo de 385nm a luz é denominada de ultravioleta e acima de 760nm de infravermelha, ambas não visíveis pelo homem (Miserendino, Pick, 1995).

O reparo tecidual é um processo interativo e dinâmico que envolve mediadores, células e matriz extra-celular, esta interação entre a radiação e a reparação tecidual pode gerar efeitos biomoduladores e bioestimuladores, porém a radiação deve ser absorvida para produzir uma mudança física e/ou química, que resulte em uma resposta biológica, ou seja, quando os parâmetros corretos são utilizados, como comprimento de onda, densidade de energia, tempo de irradiação e afinidade com o tecido irradiado efeitos biológicos são afetados positivamente (Bjordal et al., 2003).

Os lasers são classificados na literatura, como lasers de baixa e alta intensidade, sendo as principais diferenças entre eles relacionadas à potência e o mecanismo de ação, onde os lasers de alta

potência agem por aumento de temperatura e os de baixa por mecanismos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológico (Al-Watban, Zhang, 1997). O tipo de laser mais utilizado nos tratamentos clínicos odontológicos é o laser em baixa potência, uma vez que tem ação analgésica, antiinflamatória e bioestimulante, contribuindo para regeneração tecidual. A radiação laser de baixa potência é bem tolerada pelos tecidos e pode ser utilizada sem riscos para o paciente (Damante et al., 2004; Nícoli et al., 2006).

Os tipos mais utilizados com estas finalidades são radiação laser Hélio-Neônio (HeNe), Arseneto de Gálio (AsGa) e Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl). O AsGaAl age na estimulação seletiva das mitocôndrias, promovendo o aumento na produção de ATP, além de atuar no alívio de dor e em regiões com edema, auxiliando no controle do processo inflamatório e, conseqüentemente, estimulando o reparo tecidual (Karu, 1998). Qualquer efeito biológico observado é atribuído a um evento não térmico (Gavish et al., 2004; Youssef et al., 2008).

2.3.1 Mecanismo de Ação do Laser de Baixa Potência

Os mecanismos de ação dos lasers de baixa potência estão relacionados com a mitocôndria, organela responsável pela produção de ATP. A mitocôndria é uma estrutura que produz a energia necessária para a célula funcionar. A matriz mitocôndrial apresenta enzimas essenciais para as reações usadas na geração de energia e com partículas de síntese do ATP. A energia é armazenada na forma de ATP (adenosina trifosfato). Quando a célula precisa de energia, o ATP é convertido em ADP (adenosina difosfato), que libera energia para a célula.

No modelo de Karu (1989), a laserterapia produz mudanças fotoquímicas nos fotorreceptores das mitocôndrias, que alteram o metabolismo conduzindo a transdução (processo de transferir energia de um sistema para o outro) do sinal a outras partes da célula (incluindo membranas), que finalmente conduzem a foto-resposta (biomodulação). Enquanto o laser visível provavelmente inicia a cascata de eventos na cadeia respiratória das mitocôndrias, por eventos fotoquímicos (provavelmente a fotoativação de enzimas), Smith (1993) sugere que, por causa das propriedades fotofísicas e fotoquímicas da radiação infravermelha, esta inicie a cascata de eventos metabólicos através de efeitos fotofísicos sobre as membranas (provavelmente nos canais de Ca^{+}), conduzindo a mesma resposta final.

A absorção da luz por um cromóforo em uma célula produz as mudanças físicas ou químicas nesta molécula e conseqüentemente, respostas biológicas podem ser observadas. Quando a luz interage com células ou tecido, se administrada na dose adequada, pode estimular certas funções. Esse efeito é particularmente evidente se a célula em questão tem a sua função debilitada (Karu, 1998).

Segundo Zezell (2004), a laserterapia pode estimular o crescimento celular de tecidos ósseos, regeneração celular, remodelação vascular, promover maior atividade tissular e função nervosa estimulada (alteração no potencial de ação das células nervosas).

2.3.2 Aplicação da laserterapia

Recentemente estudos sobre os efeitos da biomodulação da irradiação do laser de baixa potência têm sido apresentados. Na área da ortodontia a laserterapia tem sido utilizada para diversos procedimentos, como no processo de remodelação óssea, no aumento da

velocidade da movimentação ortodôntica, na redução de dor após ativação do aparelho ou no tratamento de úlceras traumáticas na mucosa bucal causadas pelos brackets (Rodrigues, 2001).

Ozawa et al., (1998) investigaram a ação do laser de baixa potência AsGaAl (830 nm, 500 mW) em células osteoblásticas de calvária de ratos. A irradiação laser estimulou a proliferação e diferenciação celular, uma maior atividade da Fosfatase Alcalina e posteriormente um aumento da expressão do gene Osteocalcina (OC). Por tanto, os autores concluíram que a irradiação com laser de baixa potência promove um aumento significativo no número de células osteoblásticas bem como na formação óssea.

Cruz et al., (2004) estudaram, clinicamente, os efeitos da radiação laser AsGaAl, comprimento de onda de 780 nm e densidade de energia 5 J/cm^2 , na movimentação ortodôntica (MO) de caninos superiores, com intuito de promover a retração dos elementos dentários, em pacientes normoglicêmicos. A MO foi realizada durante 2 meses e a aplicação da radiação laser AsGaAl foi realizada em cinco pontos, com tempo de exposição de 10 segundos para cada ponto. Estes pontos estavam localizados nas faces vestibular e palatina e a ativação da força ortodôntica ocorreu a cada 30 dias. Onze pacientes foram selecionados, sendo as hemiarcadas superiores divididas em dois grupos: região de caninos não irradiada (controle) e região de caninos irradiada (tratado). Os autores puderam concluir que, clinicamente, houve maior MO nos grupos tratados do que no controle.

Stein et al., (2005) realizaram um estudo para investigar o efeito do laser de baixa potência He-Ne (632 nm, 10 mW) em células osteoblásticas de humanos *in vitro*. Os autores observaram a proliferação das células 24 e 48 horas depois da 2ª irradiação, concluíram que o laser de baixa potência promoveu maior proliferação, mais rápida diferenciação e maturação dos osteoblastos humanos, comparando com o grupo de células não irradiadas.

Um dos primeiros trabalhos, com finalidade ortodôntica, sobre a influência do laser de baixa potência no reparo ósseo, após a cirurgia de expansão transversal da maxila em ratos, foi publicado por Saito, Shimizu, 1997. Nesse estudo o laser utilizado foi o GaAlAs (830 nm, modo contínuo, 100 mW, 35,3 J/cm²). Os animais foram divididos em 3 grupos, sendo o grupo 1: controle sem aplicação do laser, grupo 2: irradiações realizadas somente no dia da cirurgia e grupo 3: irradiações realizadas nos 3 primeiros dias do pós-operatório. Os resultados mostraram que a neoformação óssea e a maturação das trabéculas ósseas foram mais expressivas quando o laser foi aplicado precocemente nos primeiros dias do pós-operatório. O laser usado somente em uma sessão não mostrou diferença de resultado com o grupo controle. Os autores concluíram que a regeneração óssea não somente depende da dose aplicada, mas também do intervalo de tempo das aplicações.

Goulart et al., (2006) realizaram um estudo comparativo entre as densidades de energia da radiação laser AsGaAl (780 nm, 70 mW) durante a movimentação ortodôntica (MO) dos pré-molares superiores, em cães. A quantidade de MO foi analisada clinicamente. Dezoito cães foram utilizados, sendo divididos em dois grupos: cães irradiados com 5,25 J/cm² (n=9) e cães irradiados com 35 J/cm² (n=9). A aplicação da radiação laser foi realizada na região do osso alveolar da região dos pré-molares superiores do lado direito, sendo o lado esquerdo, de ambos os grupos, utilizados para os controles. Os autores puderam concluir que houve maior MO nos cães irradiados com 5,25 J/cm² do que nos irradiados com 35 J/cm², tendo como referência a quantidade de movimentação dos cães do grupo controle.

Youssef et al., (2008), também, avaliaram o efeito da radiação laser AsGaAl (809 nm, 8 J/cm² e 100 mW) na movimentação ortodôntica de caninos superiores e no nível de dor em paciente normoglicêmicos. Quinze pacientes foram selecionados, com idade entre 14 e 23 anos. O plano de tratamento ortodôntico preconizado incluiu

extrações dos primeiros pré-molares superiores e inferiores, para o correto alinhamento dos dentes. Em seguida, o tratamento ortodôntico foi iniciado 14 dias após a extração dos pré-molares. O movimento de retração dos caninos foi realizado com uso de molas fechadas, pré-fabricadas em ambos os arcos. O lado direito das arcadas foi submetido à radiação laser, enquanto que o lado oposto foi utilizado como controle. O laser foi aplicado nos dias 0, 3, 7 e 14. A mola de retração foi reativada no 21^o dia em ambos os lados. Os autores observaram que a velocidade de movimentação do canino foi maior e a intensidade da dor menor no lado irradiado.

Segundo Kawasaki e Shimizu, 2000; Cruz et al., (2004); Youssef et al., (2008); Yamaguchi et al., (2009); Kim et al., (2007); Fujita et al., (2008), a terapia com laser de baixa potência pode aumentar a velocidade de movimentação dentária durante o tratamento ortodôntico, devido ao aumento da capacidade de remodelação do osso alveolar.

2.4 Sistema RANK/RANK-L/OPG

Em 1995, Suda et al., propuseram um modelo hipotético para explicar o papel das células do estroma que quando estimuladas por fatores sistêmicos ou locais seriam capazes de induzirem a formação dos osteoclastos. As células do estroma apresentam os seguintes receptores: vitamina D3 (VDR); sistema proteína quinase A; glicoproteína 130, esses receptores são ativados por diferentes estímulos, quando ativados, as células expressam um fator de diferenciação dos osteoclastos, chamado Receptor Ativador de NFκ-B Ligante (RANKL), que se liga à membrana do osteoclasto (Hofbauer et al., 2000; Moschen et al., 2005).

O RANKL é um peptídeo com 317 aminoácidos e pertencente à família de fatores de necrose tumoral, podendo se

apresentar em duas formas: solúvel e ligado à membrana. O RANKL se liga ao RANK (receptor activator de NFκ-B) presente nas células progenitoras dos osteoclastos e na presença de fator estimulante de colônia de macrófago (M-CSF), estimula a diferenciação e atividade dos osteoclastos (Hofbauer et al., 2000; Haynes, 2004; Rogers, Eastell., 2005). Camundongos deficientes de RANKL não apresentam formação de osteoclastos e desenvolvem severa osteopetrose, além de defeito dos nódulos linfáticos e células B. Em animais normais, ao injetar RANKL solúvel, verificou-se a rápida indução de hipercalcemia associada à perda óssea (Lacey et al., 1998).

O RANKL tem sido relatado como mediador de várias doenças: artrite reumatóide (Stolina et al., 2005); osteoporose pós-menopausa; osteoporose induzida por glicocorticóide; osteólises peri-protéticas; hiperparatireoidismo; doença de paget; mieloma ósseo; metástases ósseas e infecções periodontais (Haynes, 2004; Moschen et al., 2005; Anandarajah, Schwarz, 2006).

O RANKL exerce suas ações via interação com o receptor RANK, o qual é uma proteína de membrana com 616 aminoácidos, da superfamília dos receptores de fator de necrose tumoral (TNFR), expressa primariamente em células precursoras dos osteoclastos, células B e T, células dendríticas e fibroblastos (Hsu et al., 2006; Anandarajah, Schwarz, 2006). Camundongos que não produzem RANK desenvolvem osteopetrose e defeito na maturação das células B e T (Lu et al., 2004; Hsu et al., 2006). A interação entre RANKL e seu receptor RANK nos osteoclastos é controlada pela osteoprotegerina (OPG) (Tang et al., 2006; Beeton et al., 2006).

A OPG é uma proteína de 401 aminoácidos pertencente à superfamília dos receptores de fator de necrose tumoral (TNFR). É um receptor solúvel e age inibindo a ligação do RANKL ao RANK, impedindo, assim, o recrutamento, a proliferação e a ativação dos osteoclastos (Boyle et al., 2003; Théoleyre et al., 2006). Em camundongos, a expressão de

RNA mensageiro de OPG tem sido demonstrada em vários tecidos, como: osso, pele, fígado, pulmão, coração, células endoteliais, rins, estômago, intestino, glândula tireóide, cérebro e medula espinhal (Knudsen et al., 2003; Anandarajah, Schwarz, 2006).

A OPG neutraliza os efeitos biológicos de RANKL, pois inibe a diferenciação de osteoclastos, suprime a ativação dos osteoclastos maduros e induz sua apoptose (Horowitz et al., 2001; Nakamichi et al., 2007). Animais que não produzem OPG apresentam severa osteoporose pelo aumento da atividade osteoclástica e subsequente reabsorção óssea (Yamazaki, Sasaki, 2005; Nakamichi et al., 2007). Injeções subcutâneas de OPG na área abdominal de mulheres pós-menopausa rapidamente reduziram os marcadores do *turnover* ósseo (Hsu et al., 2006). Além disso, a administração de OPG em animais com artrite induzida experimentalmente, protegeu-os da perda óssea, enquanto os animais que não receberam OPG apresentaram extensa perda óssea e de cartilagem. Ainda não está clara, entretanto, a associação entre o conteúdo mineral ósseo, o risco de fratura e a concentração plasmática dessa molécula (Knudsen et al., 2003; Anandarajah, Schwarz, 2006).

O balanço da expressão RANK-RANKL-OPG tem sido estudado em casos de osteoporose (Golmia, Scheinberg, 2004), osteopetrose (Kobayashi et al., 2009), artrite reumatóide (Gallagher, 2008), doença periodontal (Peruzzo et al., 2008; Boyle, 2003), tumores odontogênicos (da Silva et al., 2008), movimentação ortodôntica (Yamaguchi, 2009) e diabetes (Amorim et al., 2008). Este balanço controla a remodelação óssea (Rogers, Eastell, 2005; Kawai et al., 2006). Alterações na concentração dessas moléculas induzidas por variações dos níveis de outras citocinas, administração de glicocorticóides ou deficiência de estrogênio podem induzir aumento do número e da atividade dos osteoclastos, determinando perda de massa óssea (Hofbauer et al., 2000; Yamaguchi, 2009).

Recentes estudos têm mostrado baixos níveis do RANKL e OPG em sítios de reabsorção óssea em pacientes diabéticos (Duarte et al., 2007). Em contraste, outros autores associam a alta expressão desses fatores ao estado diabético (Galluzzi et al., 2005; Hie et al., 2007; Kayal et al., 2007). Existem controvérsias acerca da atividade osteoclástica associada ao diabetes mellitus (He et al., 2004; Hie et al., 2007; Kayal et al., 2007; Yamaguchi et al., 2009). Desta forma, os autores relatam a importância de estudos dos marcadores de turnover ósseo (Figura 1).

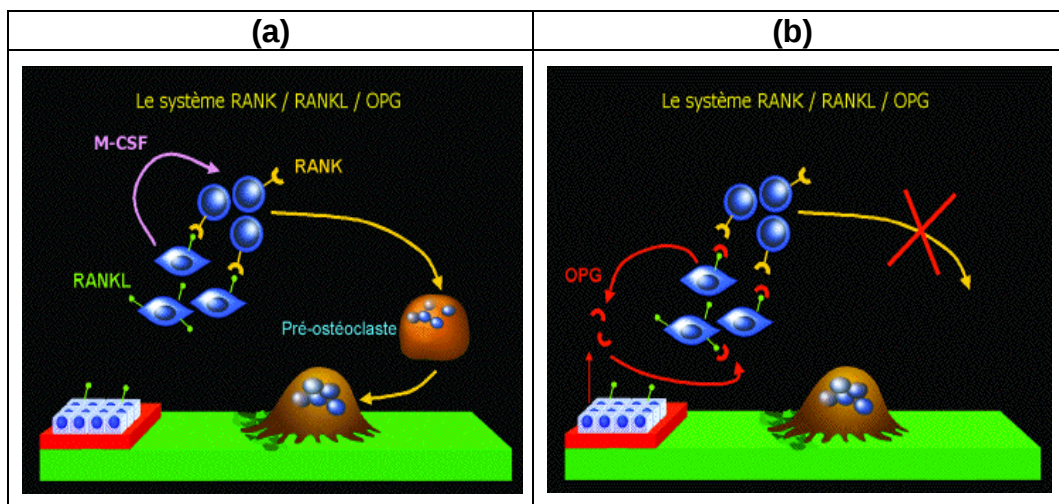


Figura 1 – Sistema RANK/RANKL/OPG. (a) Ativação da via osteoclástica favorecendo a reabsorção óssea através da ligação RANK/RANKL; (b) Inibição da ativação osteoclástica preservando a matriz óssea através da produção de OPG. Chappard et al., 2003.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi analisar por meio de reações histomorfológicas e imuno-histoquímicas, o processo de remodelação óssea alveolar decorrente do movimento ortodôntico induzido em ratos diabéticos e a influência da aplicação do laser de baixa potência AsGaAl ($\lambda=780$ nm), durante o período experimental de 7, 14 e 21 dias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – FOSJC-UNESP e aprovado de acordo com protocolo nº 11/2011-PA/CEP (Anexo A).

4.1 Animais

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA.

Foram utilizados 60 ratos jovens machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, *Wistar*), com 60 dias de idade ao início do experimento, pesando cerca de 200g a 250g, os quais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas e alimentados com dieta balanceada LABINA➤ (fabricante: GUABI- Guabi nutrilabor para ratos e camundongos) e água “*ad libitum*”.

4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram inicialmente divididos de modo randomizado em quatro grupos com 5 animais cada e avaliados nos períodos de 7, 14 e 21 dias de movimentação ortodôntica:

- ♦ **Controle (C)** - ratos normoglicêmicos submetidos à movimentação ortodôntica;
- ♦ **Laser (L)** - ratos normoglicêmicos submetidos à movimentação ortodôntica e tratados com radiação laser AsGaAl;
- ♦ **Diabetes (D)** - ratos diabéticos submetidos à movimentação ortodôntica;
- ♦ **Diabetes-Laser (D-L)** - ratos diabéticos submetidos à movimentação ortodôntica e tratados com radiação laser AsGaAl.

4.3 Procedimentos Clínicos

4.3.1 Anestesia

Foram utilizadas para anestesia geral a solução de cloridrato de Ketamina base (Dopalen - Agribands do Brasil LTDA - 5 mg/kg), anestésico geral e a solução de cloridrato Xilazina de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Anasedan - Bayer do Brasil – 10 mg/kg), substância com propriedades sedativa, analgésica e relaxante

muscular, nas respectivas proporções de 0,5 ml / 1 ml na dose de 0,1 ml / 100 g de peso, via intramuscular.

4.3.2 Indução do Diabetes

A indução do diabetes foi realizada sete dias antes dos procedimentos ortodônticos. O fármaco diabetogênico utilizado foi a aloxana monoidratada (Sigma Aldrich Chemical, Saint Louis, MO, USA). Os animais permaneceram em jejum por 12 horas antes da indução, recebendo apenas água.

A solução de aloxana foi preparada no momento do uso. Os animais foram previamente anestesiados e pesados (Figura 2), e a droga administrada por via endovenosa pela veia peniana na dose de 40 mg/Kg (Figura 3).



Figura 2 – Preparo para indução do Diabetes. (a) Pesagem do aloxano; (b) Pesagem do animal.

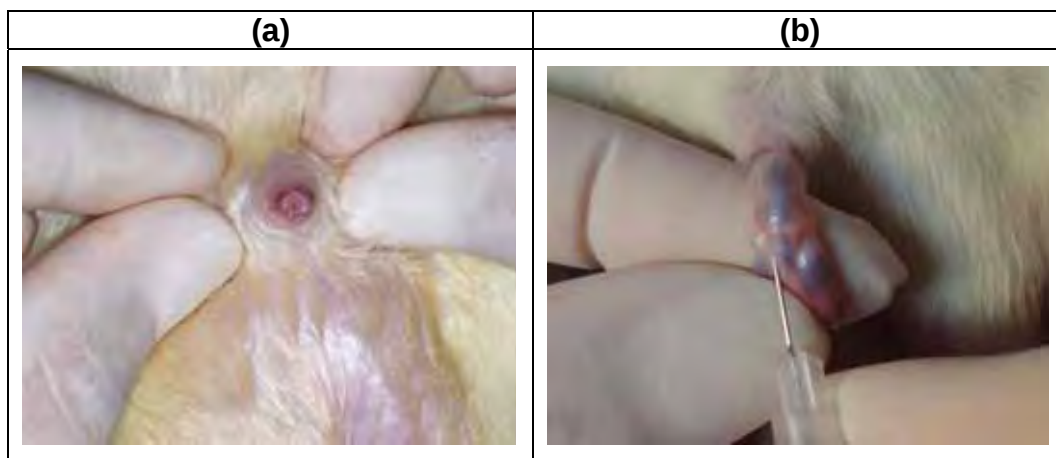


Figura 3 – Indução do Diabetes. (a,b) Administração do aloxano por via endovenosa através da veia peniana.

4.3.3 Mensuração da Glicemia

Para a monitoração do diabetes, foram utilizadas amostras de sangue da veia caudal dos animais e os valores da concentração de glicose no sangue (mg/dL) mensurados com o auxílio de um monitor para glicemia e tiras teste (ONETOUCH ULTRA, Lifescan Johnson & Johnson Company, Califórnia, USA). Os animais foram considerados diabéticos quando a concentração de glicose no plasma estava 80% acima da média dos valores obtidos em nível basal.

A glicemia foi mensurada em nível basal antes da indução do diabetes, sete dias após a indução e no momento da eutanásia dos animais (Figura 4).

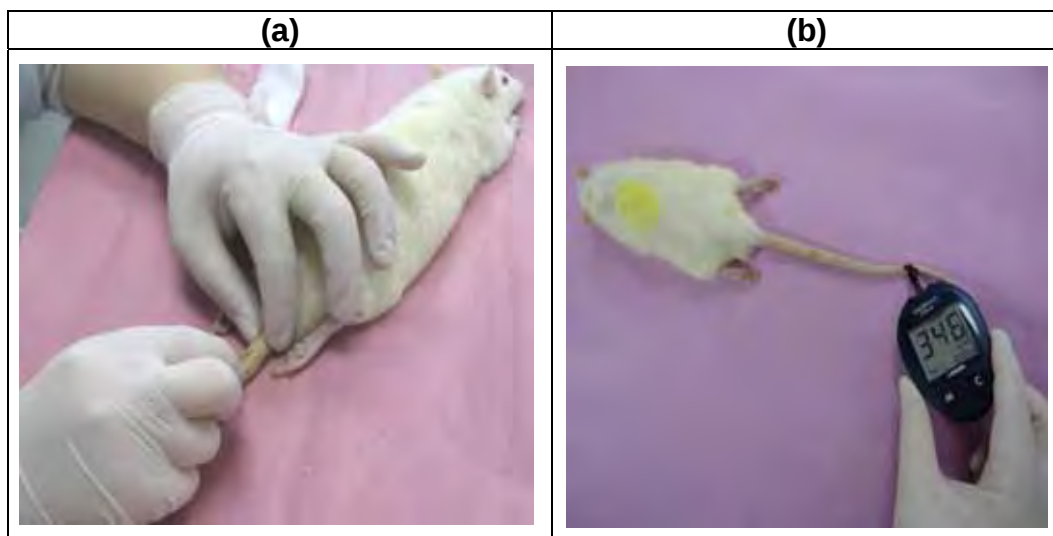


Figura 4 - Monitoramento da glicemia do animal. (a) Punção da veia caudal; (b) Mensuração da glicemia.

4.3.4 Instalação do Dispositivo Ortodôntico

Após sete dias da indução do diabetes, e comprovada sua estabilização através da mensuração da glicemia basal, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (5 mg / Kg) associado à xilazina (10 mg / kg), administrados por via intramuscular (IM = 0,1 ml / 100 g). Os animais foram colocados em uma mesa cirúrgica em decúbito dorsal e com auxílio de 2 abridores de boca confeccionados manualmente, foi instalada uma mola fechada de NiTi (Morelli[➤] Campinas – São Paulo Brasil) no primeiro molar inferior, o qual foi submetido à movimentação ortodôntica e distendida até o incisivo inferior, ambos do lado direito, a mola exerceu uma força de 20 cN medida com tensiômetro de precisão (Rock Mountain Orthodontics[➤], Denver, USA). O dispositivo foi fixado no incisivo inferior com resina composta fotoativada (Quick Cure Reliance Orthodontic Products[➤], Itaska, USA) (Figura 5).

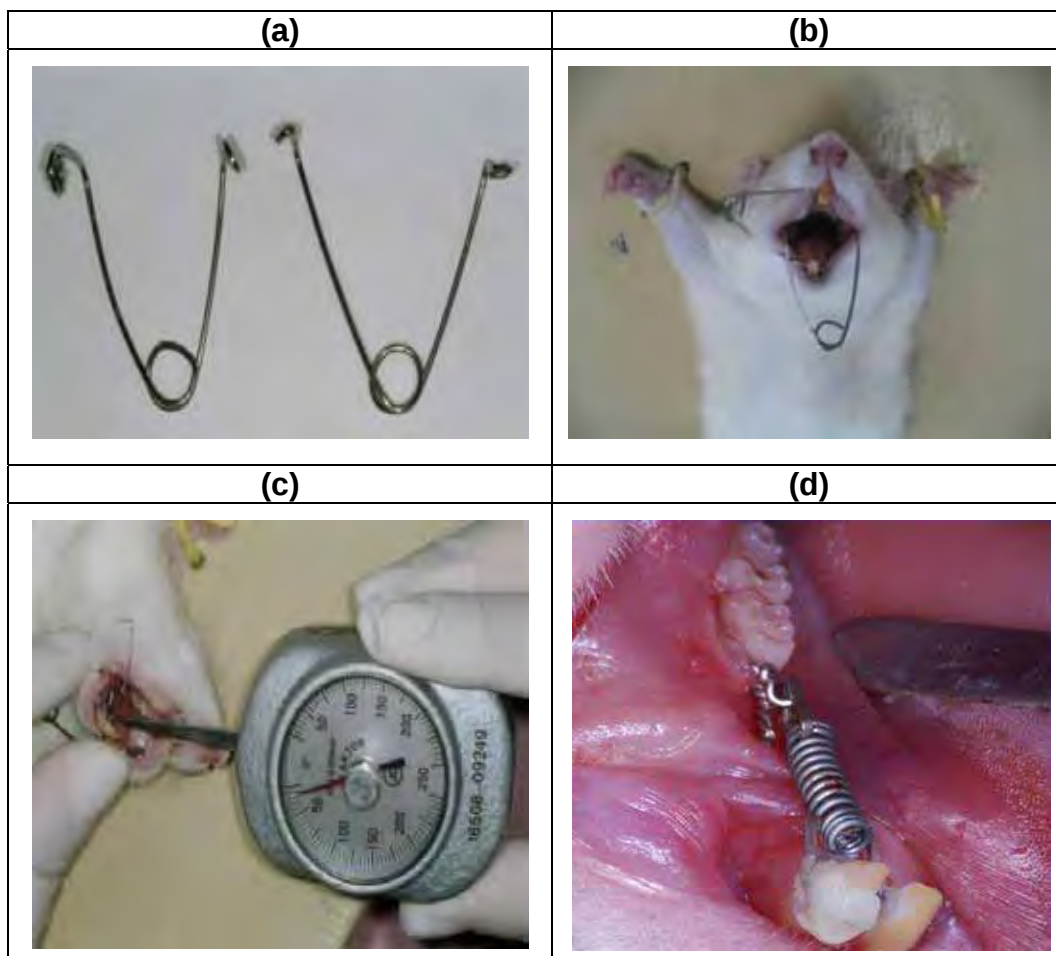


Figura 5 – Instalação do dispositivo ortodôntico. (a) Abridores de boca adaptados e confeccionados com fio de aço inoxidável de 0,8 de diâmetro; (b) Aplicação do abridor de boca adaptado no animal; (c) Mensuração da força que será exercida pela mola de NiTi com o tensiômetro de precisão; (d) Instalação da mola de NiTi no primeiro molar e distendida até o incisivo inferior direito, fixada com resina fotoativada.

4.3.5 Laserterapia

O equipamento utilizado foi o Twin Flex II (Arcada - Mm Optics). A radiação laser AsGaAl foi aplicada de maneira pontual e contínua na região vestibular do primeiro molar inferior direito, nos grupos Laser e Diabetes Laser com comprimento de onda de 780 nm, densidade de energia de 20 J/cm², tempo de exposição de 40 segundos e potência de 20 mW, em dias alternados até a eutanásia dos animais (Figura 6).

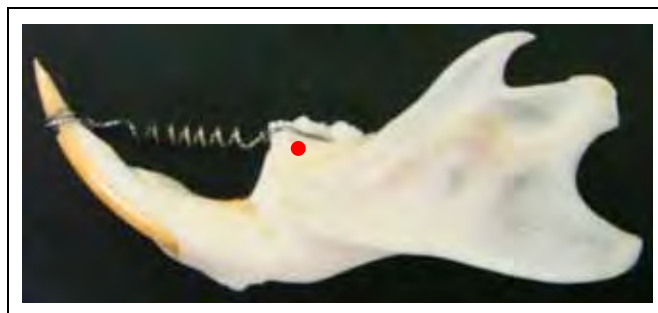


Figura 6 - Mandíbula de rato com aparelho ortodôntico adaptado indicando a região vestibular do primeiro molar inferior, onde foi aplicado a radiação laser AsGaAl.

4.3.6 Eutanásia

A eutanásia dos animais foi realizada por overdose de anestésico nos períodos de 7, 14 e 21 dias após a instalação do dispositivo ortodôntico, sendo 5 animais por grupo experimental. Foi feita a decapitação dos mesmos, a mandíbula removida, o tecido mole excedente eliminado permanecendo apenas a parte óssea que foi imersa em solução fixadora de paraformaldeído tamponado (Sigma Aldrich Chemical, Saint Louis, MO, USA) a 4%.

4.4 Processamento Histológico

Quarenta e oito horas após a fixação das mandíbulas em paraformaldeído a 4%, estas foram hemisseccionadas e imersas em solução aquosa de EDTA (Sigma Aldrich Chemical, Saint Louis, MO, USA) a 10% à temperatura ambiente e agitação constante para desmineralização por aproximadamente 90 dias ou até serem consideradas próprias para a microscopia através do teste da agulha.

As peças foram lavadas em água corrente por 4 horas, desidratadas em etanol, diafanizadas e incluídas em parafina com a face lingual voltada para o plano de corte. Cortes frontais seriados com espessura de 3 µm em lâminas silanizadas foram obtidos para análise imuno-histoquímica e cortes frontais seriados com espessura de 5 µm foram obtidos e corados por hematoxilina e eosina (HE) para análise histomorfológica.

4.5 Análise Histomorfológica

A análise histomorfológica foi realizada em cortes histológicos corados por HE, onde foram descritas as alterações estruturais evidenciadas no periodonto durante a movimentação ortodôntica, tais como: presença de células inflamatórias, aspectos do ligamento periodontal, reabsorção e formação do tecido ósseo alveolar nas faces mesial e distal do septo interradicular e face mesial do septo interdentário do primeiro molar inferior direito.

As lâminas histológicas foram fotografadas e as imagens capturadas por meio de câmera digital de alta resolução AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplada ao microscópio de luz (Axioskop 40, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). A câmera apresentava-se conectada a um microcomputador contendo um programa de aquisição e análise de imagens Axiovision Release 4.7.2 (Carl Zeiss Vision Imaging Systems, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

4.6 Análise Imuno-histoquímica

Os marcadores imuno-histoquímicos utilizados foram os anticorpos monoclonal de rato para Osteoprotegerina - OPG (scN-20) e o monoclonal de rato para RANK-L (scN-19), adquiridos da Santa Cruz Biotechnology®, CA, USA.

Os cortes histológicos em lâminas silanizadas foram submetidos a reações de imuno-histoquímica segundo o protocolo do laboratório de imuno-histoquímica da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – FOSJC/UNESP:

- a) desparafinização das lâminas em placa aquecedora a 60°C por 30 minutos;
- b) desparafinização em 2 banhos de xilol (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 10 minutos cada a temperatura ambiente;
- c) reidratação em uma série de etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) em concentrações decrescentes (absoluto, 90%, 80% e 70%) por 5 minutos cada, seguido de lavagem rápida em água destilada;
- d) recuperação antigênica. Para OPG as lâminas foram acondicionadas e imersas em recipiente de vidro contendo citrato, pH 6,0 (Merck, Darmstadt, Alemanha), e levadas ao forno de microondas (Panasonic, inveter, Brasil) onde foram submetidas a 2 ciclos consecutivos de 3 minutos a potência 5, seguida de resfriamento por 30 minutos a temperatura ambiente e lavagem em água corrente por 5 minutos. Para RANK-L as

lâminas foram acondicionadas e imersas em recipiente de vidro contendo pepsina, pH 1,8 (Sigma Aldrich), levadas à estufa a 60°C por 10 minutos e após em estufa a 37°C por 50 minutos, seguida de lavagem em água corrente por 5 minutos;

- e) acondicionamento das lâminas em caixas de incubação específica para técnica de imunohistoquímica (Erviagas, São Paulo, SP);
- f) bloqueio da peroxidase endógena tecidual por peróxido de hidrogênio 1% (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 30 minutos;
- g) lavagem com solução Tris/Triton por 15 minutos;
- h) lavagem com solução Tris por 5 minutos;
- i) incubação com soro albumina bovina (BSA) 1% (Dako, Califórnia, USA) por 30 minutos, em câmara úmida, para eliminação dos anticorpos inespecíficos;
- j) lavagem rápida com solução Tris;
- k) incubação com os anticorpos primários (RANK-L e OPG) na diluição de 1:100 por 2 horas;
- l) lavagem em solução Tris por 5 minutos;
- m) incubação do anticorpo secundário Biotina (LSAB+Sys-HRP - DAKO CO., Califórnia, USA) por 10 minutos à temperatura ambiente;
- n) lavagem em solução Tris por 5 minutos;
- o) incubação do anticorpo secundário streptavidina (LSAB+Sys-HRP - DAKO CO., Califórnia, USA) por 10 minutos à temperatura ambiente;
- p) lavagem em solução Tris por 5;

- q) revelação da reação com solução de diaminobenzidina (DAB) (DAKO CO., Califórnia, USA) por 1 minuto;
- r) imersão em solução Tris por 10 minutos;
- s) contra-coloração com a hematoxilina de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- t) lavagem por 5 minutos em água corrente seguindo-se duas passagens em água destilada;
- u) os cortes foram desidratados em cadeia crescente de etanóis (70%, 80%, 90% e absoluto) por 5 minutos cada, diafanizados em xilol por 10 minutos e montados com resina sintética (Entellan®, Merck, Darmstadt, Alemanha) para microscopia.

Para avaliar a fidelidade da metodologia empregada na análise imuno-histoquímica, os controles negativos foram obtidos dos cortes histológicos dos respectivos grupos estudados sem a presença dos anticorpos primários RANK-L e OPG.

4.7 Análise Histomorfométrica

Para a realização da análise histomorfométrica, foi realizada contagem das células imunorreativas para os anticorpos OPG e RANK-L.

As hemimandíbulas submetidas à movimentação ortodôntica após serem desmineralizadas foram submetidas a cortes histológicos seriados de 3 µm de espessura, obtendo-se três lâminas com aproximadamente três cortes histológicos, para cada anticorpo usado.

Dentre essas lâminas, um corte de cada lâmina foi separado aleatoriamente para análise histomorfométrica. Imediatamente após, os campos histológicos de cada corte foi encontrado em aumento de 100x, e, em aumento de 400x, foi realizada a contagem das células imunorreativas em cinco campos aleatórios das faces mesial e distal do septo interradicular e face mesial do septo interdentário do osso alveolar no 1º molar inferior direito (Figura 7) usando o programa Axiovision 4.7.2 (Carl Zeiss Vision Imaging Systems, Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha). Para o procedimento de mensuração, foi utilizado um microscópio de luz (Axioskop 40, Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha) e as imagens foram captadas por uma câmera digital (AxioCam MRc5, Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha).



Figura 7 – Áreas demarcadas para análise das células imunorreativas para RANK-L e OPG do 1º molar inferior direito. Aumento original 25x.

4.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada a partir dos resultados obtidos na histomorfometria para os anticorpos OPG e RANK-L, mediante a análise de Variância (ANOVA) e ao teste de TUKEY (GraphPad Prism version 5.0 para Windows 7, GraphPad Software, San Diego, California, USA). O nível de significância adotada foi de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análise Histomorfológica

Os aspectos histomorfológicos foram analisados na região de furca do 1º molar e região interdental entre os 1º e 2º molares inferiores direito, sendo verificadas as alterações no periodonto de sustentação em conjunto com os seus respectivos elementos dentários durante 7, 14 e 21 dias de movimentação ortodôntica e submissão ou não à laserterapia.

5.1.1 Período de 7 dias

5.1.1.1 Grupo Controle

Na região interdental foi observada discreta perda das paredes ósseas do periodonto de sustentação, a gengiva apresentava-se revestida por epitélio estratificado não queratinizado com poucas camadas. Nas adjacências, a lâmina própria era composta por tecido conjuntivo, exibindo discreto infiltrado de células inflamatórias mononucleares e vasos sanguíneos de pequeno calibre. Na região do espaço biológico, o tecido conjuntivo apresentava-se bem celularizado e fibras colágenas com arranjos irregulares.

Na região de furca foi observada discreta formação de tecido ósseo, exibindo predominância de trabéculas ósseas espessas. O

ligamento periodontal apresentava espessamento contínuo em todo o contorno do dente envolvido na movimentação ortodôntica, sendo constituído por tecido conjuntivo bem celularizado e vascularizado, com discreto infiltrado de células inflamatórias mononucleares (Figura 8).

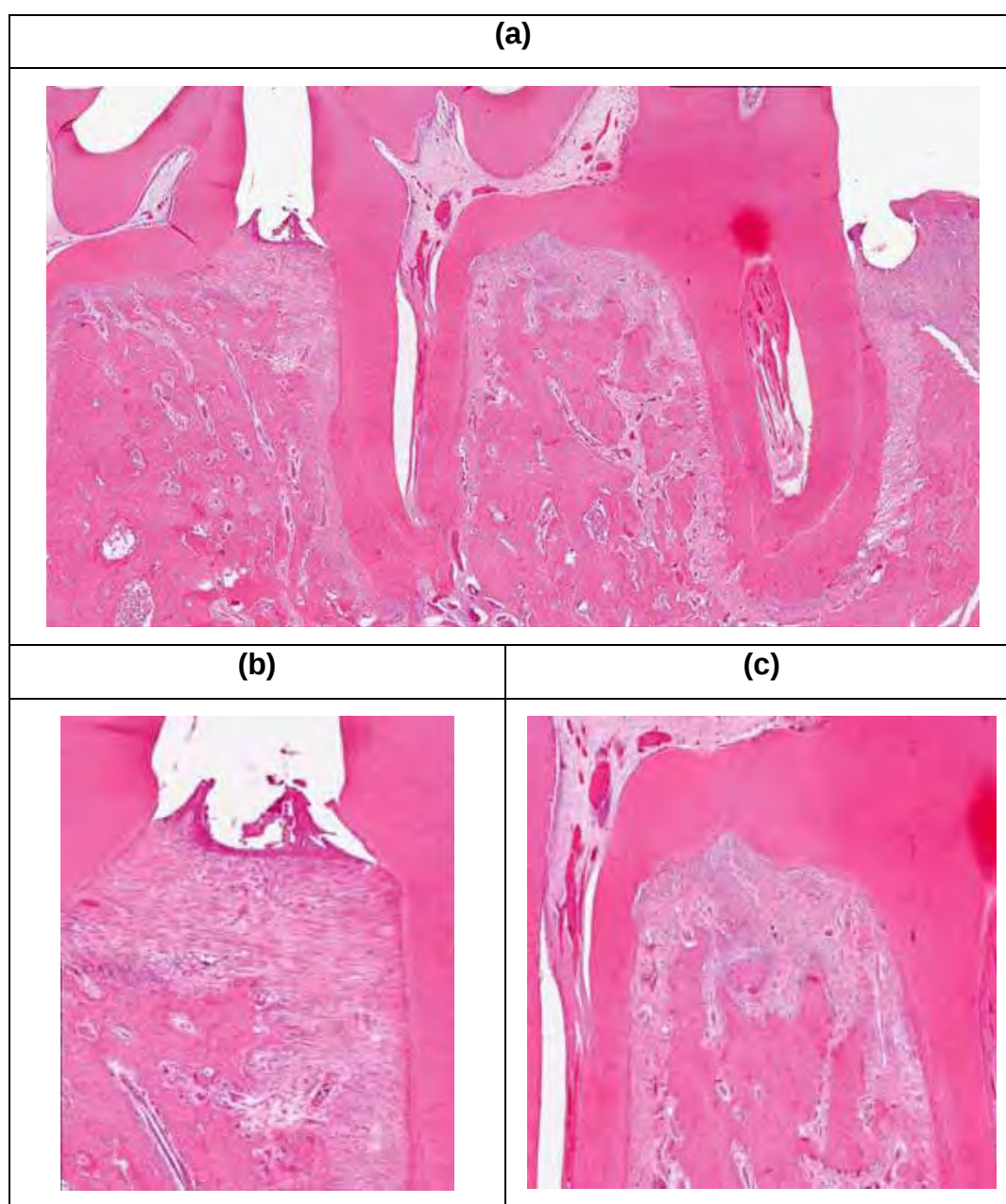


Figura 8 – Controle 7 dias. (a) Fotomicrografia panorâmica da região do 1º molar inferior direito; (b) Região interdental entre os 1º e 2º molares inferiores direitos; (c) Região de furca do 1º molar inferior direito. HE, aumento original 50x e 100x.

5.1.1.2 Grupo Laser

Na região interdental, os espécimes exibiam formação contínua de tecido ósseo na parede alveolar, papila e gengiva revestida por epitélio estratificado não queratinizado, exibindo poucas camadas de células, exocitose e projeções de cristas epiteliais interligando entre si. A lâmina própria era composta por tecido conjuntivo, exibindo discreto infiltrado de células inflamatórias mononucleares e vasos sanguíneos de pequeno calibre, localizados na região subepitelial. A maioria dos espécimes exibia espaço biológico preservado, sendo composto por tecido conjuntivo e fibras colágenas com arranjo irregular.

Na região de furca foi observada formação contínua de tecido ósseo, sem que houvesse quaisquer prejuízos na histomorfologia do periodonto de sustentação. O ligamento periodontal apresentava espessamento contínuo em todo o contorno do dente envolvido na movimentação ortodôntica, era constituído por tecido conjuntivo bem celularizado e vascularizado, com discreto infiltrado de células inflamatórias mononucleares (Figura 9).

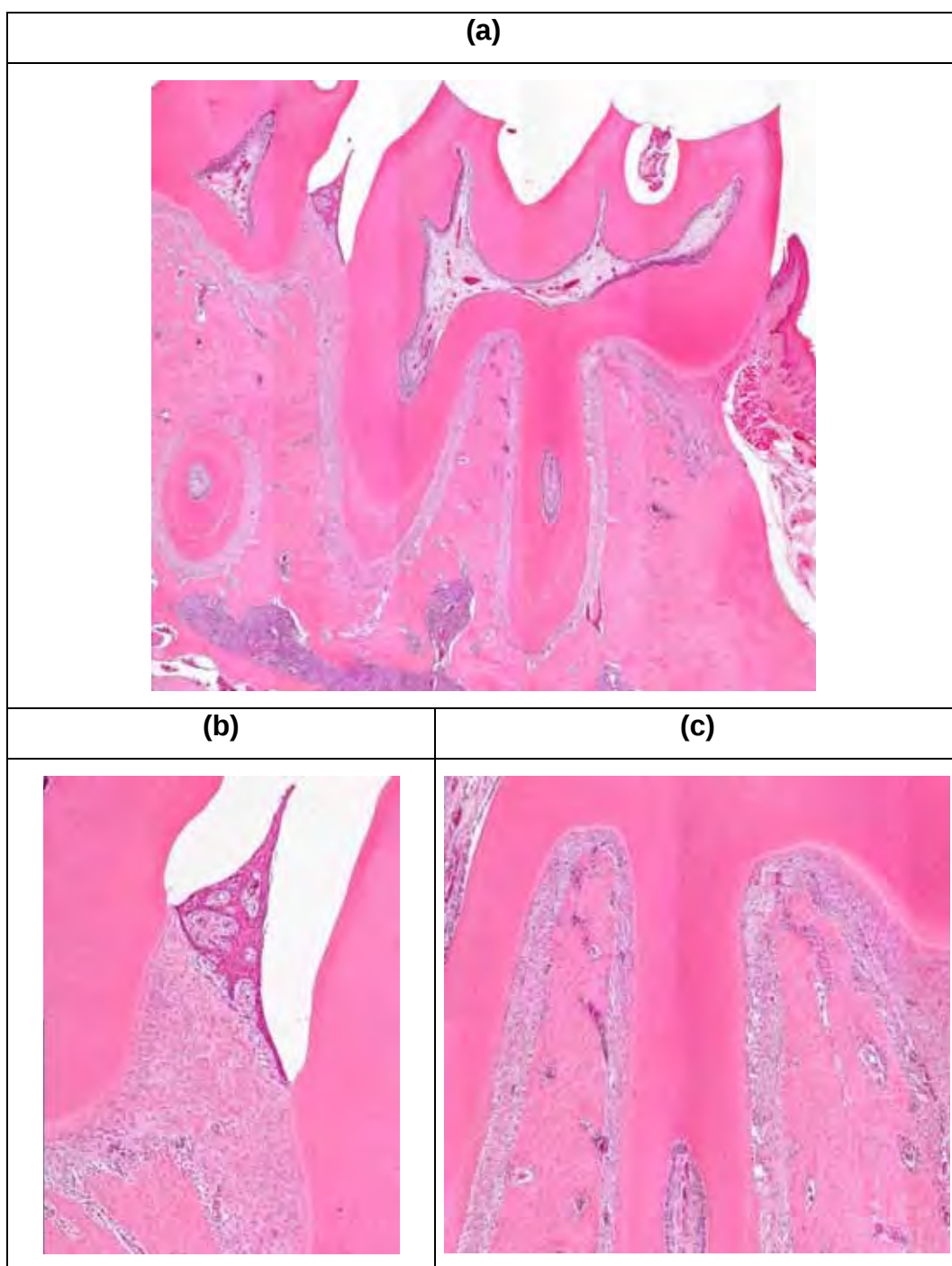


Figura 9 – Laser. 7 dias. (a) Fotomicrografia panorâmica da região do 1º molar inferior direito; (b) Região interdental entre os 1º e 2º molares inferiores direito; (c) Região de furca do 1º molar inferior direito. HE, aumento original 50x e 100x.

5.1.1.3 Grupo Diabetes

Na região interdental, os espécimes mostravam variação na quantidade de perda óssea, em discrepantes perdas ósseas, notavam-se regiões com intensa atividade osteoclástica associada às extensas áreas de tecido de granulação. A lâmina própria era composta por tecido conjuntivo ricamente celularizado e com numerosos vasos sanguíneos de calibres variados. Em adição, havia intenso e difuso infiltrado de células inflamatórias, predominantemente, mononucleares no periodonto. A gengiva encontrava-se revestida por epitélio pavimentoso estratificado, com presença de exocitose.

Na região de furca os espécimes mostravam discreta perda óssea do dente envolvido na movimentação ortodôntica (Figuras 10 e 11).

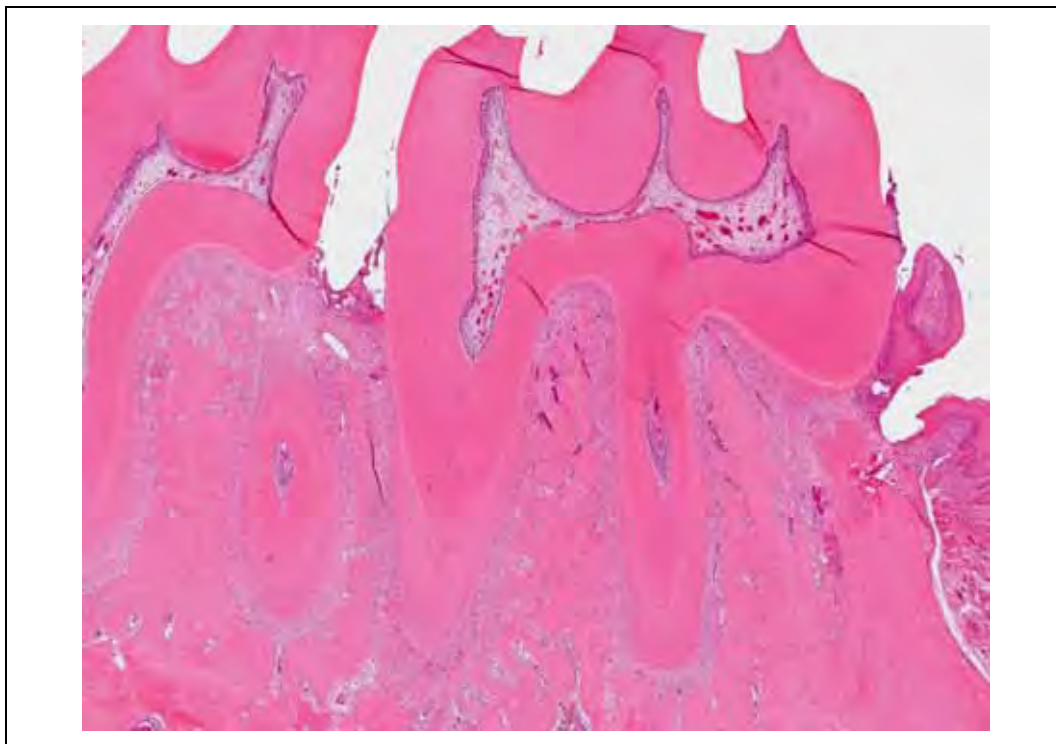


Figura 10 – Diabetes. 7 dias. Fotomicrografia panorâmica da região do 1º molar inferior direito. HE, aumento original 50x.

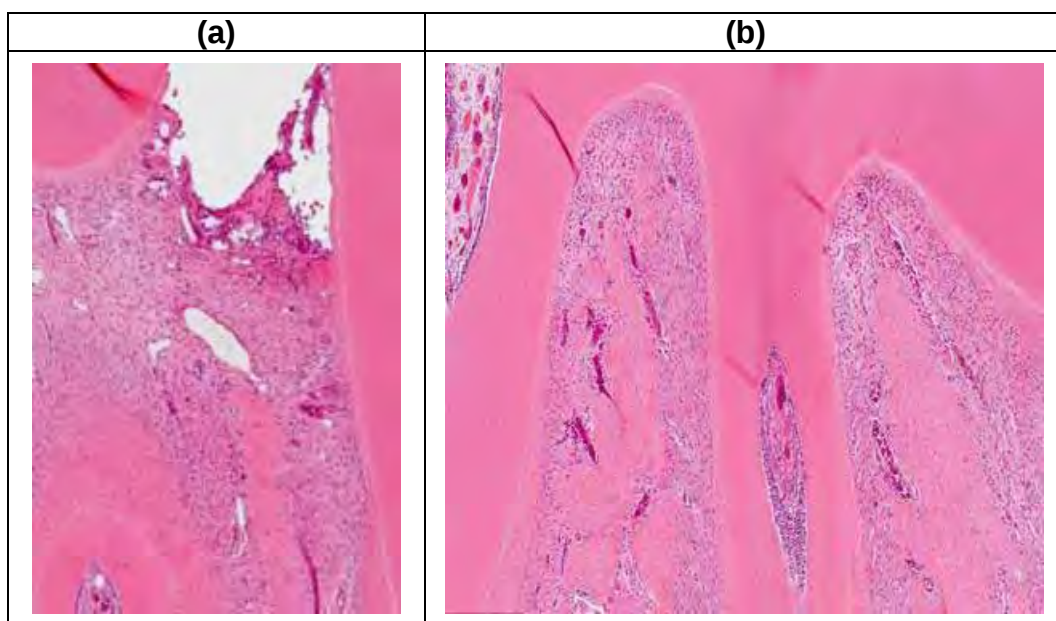


Figura 11 – Diabetes. 7 dias. (a) Região interdental entre os 1º e 2º molares inferiores direito; (b) Região de furca do 1º molar inferior direito. HE, aumento original 100x.

5.1.1.4 Grupo Diabetes-Laser

Na região interdental os espécimes apresentavam discreta a moderada destruição óssea da parede alveolar com evidenciada atividade osteoclástica, principalmente, em áreas com presença e tecido de granulação.

Na região de furca alguns espécimes exibiam preservação da região enquanto outros exibiam discreta a moderada destruição óssea da parede alveolar. Em adição, notava-se espessamento contínuo do espaço do ligamento periodontal em todo o contorno do dente envolvido na movimentação ortodôntica e dos dentes adjacentes (Figura 12).

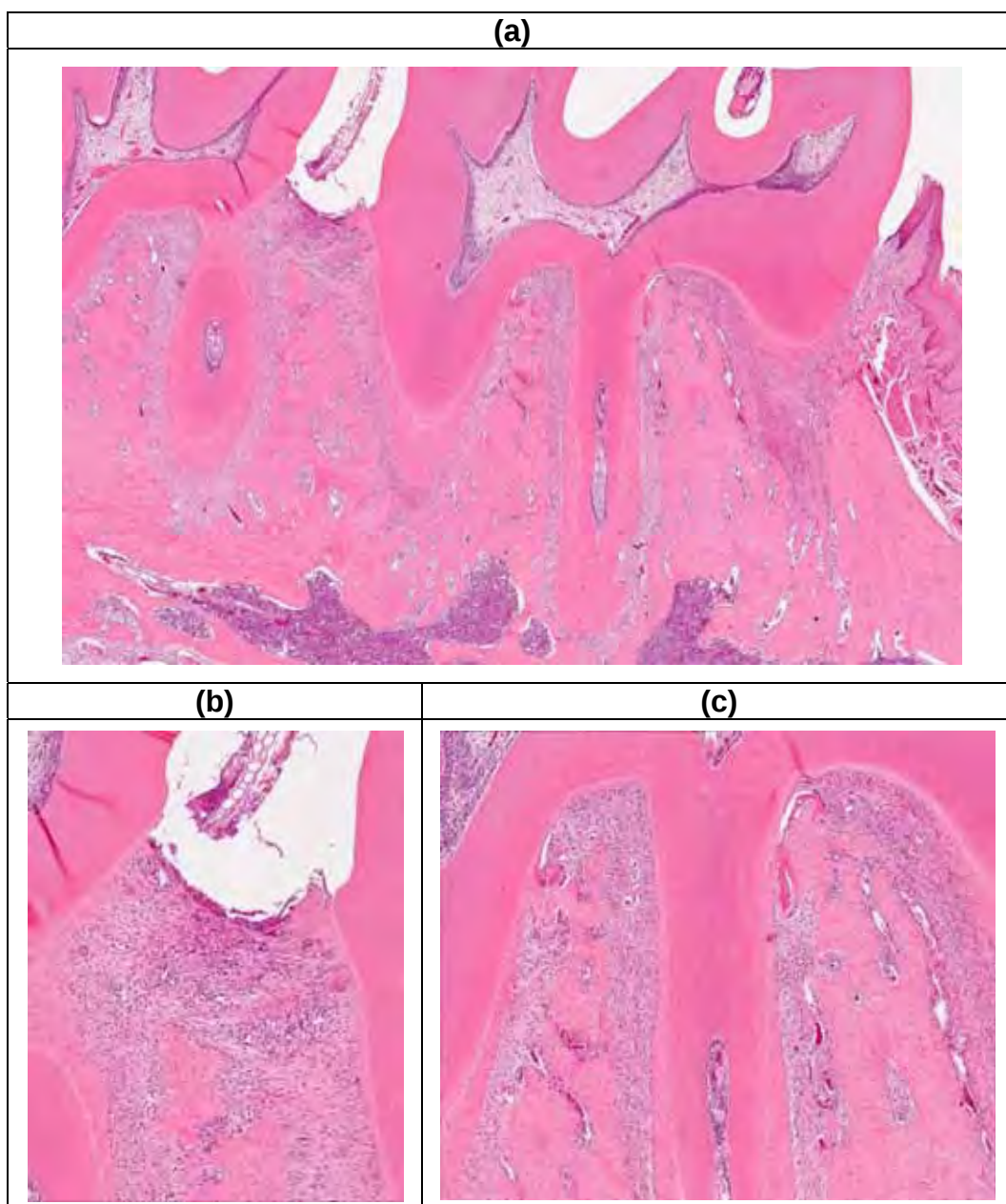


Figura 12 – Diabetes-Laser 7 dias. (a) Fotomicrografia panorâmica da região do 1º molar inferior direito; (b) Região interdental entre os 1º e 2º molares inferiores direito; (c) Região de furca do 1º molar inferior direito. HE, aumento original 50x e 100x.

5.1.2 Período de 14 dias

5.1.2.1 Grupo Controle

Na região interdental, a gengiva apresentava-se revestida por pseudomembrana serofibrinosa, apoiada sobre tecido de granulação, este era composto por fibroblastos, células endoteliais, proliferação de capilares sanguíneos e células inflamatórias. O epitélio juncional mostrava-se hiperplásico exibindo alongamento e anastomose de suas projeções, degeneração hidrópica e exocitose. A lâmina própria apresentava tecido conjuntivo com intenso infiltrado de células inflamatórias e numerosos vasos sanguíneos, todavia, notava-se que alguns fragmentos exibiam tecido de granulação. As fibras colágenas do ligamento periodontal da região interdental foram destruídas, permanecendo as fibras oblíquas e periapicais. Em adição, os espécimes exibiam reabsorções ósseas da parede do periodonto, desenvolvendo bolsas periodontais de tamanhos variados.

Na região de furca foi observada neoformação de tecido ósseo, exibindo trabéculas ósseas delicadas e irregulares além de reabsorções radiculares (Figura 13).

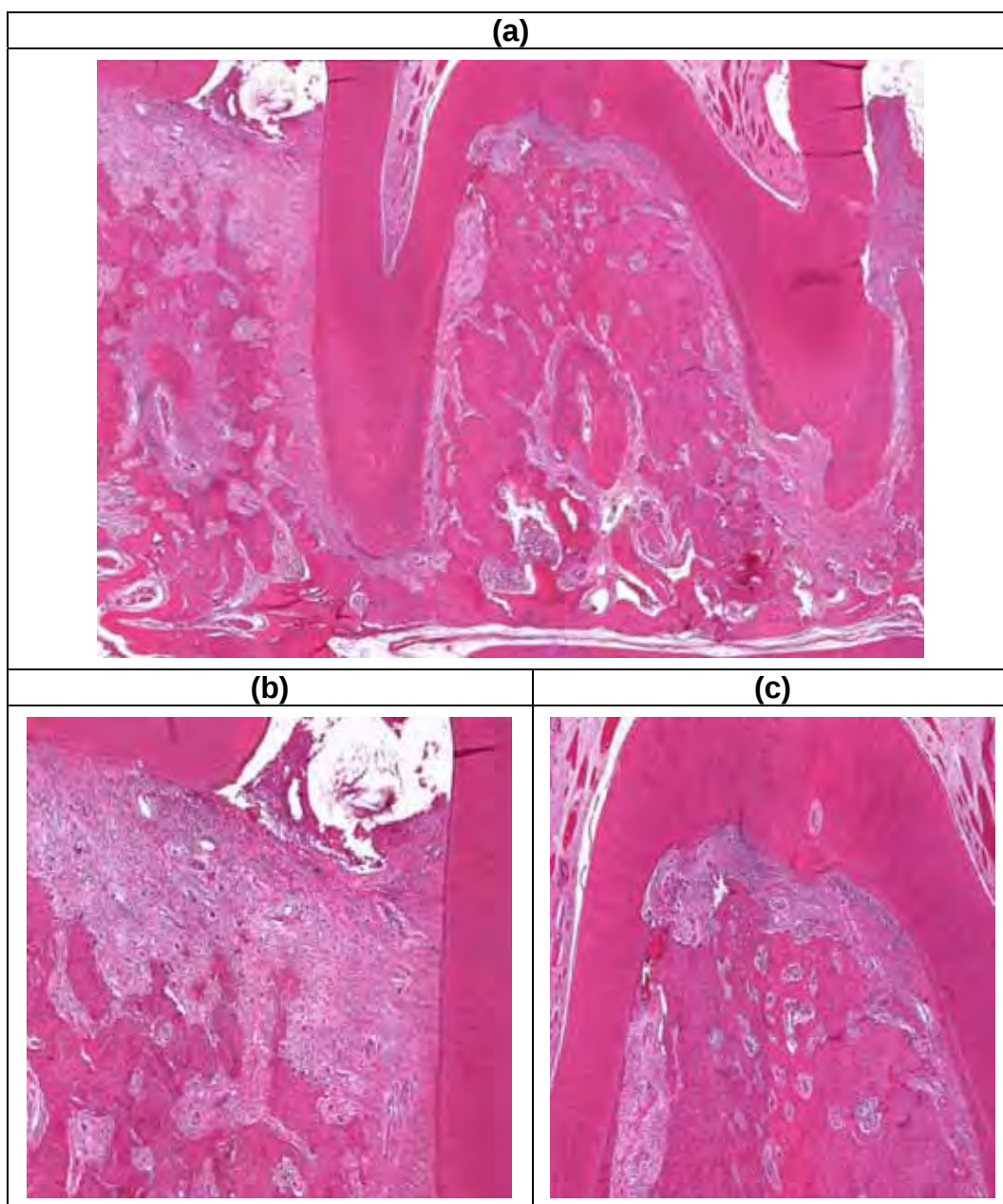


Figura 13 – Controle 14 dias. (a) Fotomicrografia panorâmica da região do 1º molar inferior direito; (b) Região interdental entre os 1º e 2º molares inferiores direito; (c) Região de furca do 1º molar inferior direito. HE, aumento original 50x e 100x.

5.1.2.2 Grupo Laser

Na região interdental, a gengiva apresentava-se revestida por epitélio pavimentoso estratificado, e exibia discreto infiltrado de

células inflamatórias mononucleares, localizadas predominantemente na região subepitelial.

Na região de furca as fibras do ligamento periodontal apresentavam-se preservadas e com aspecto de normalidade, ausência de reabsorção radicular também foi evidenciada (Figura 14).

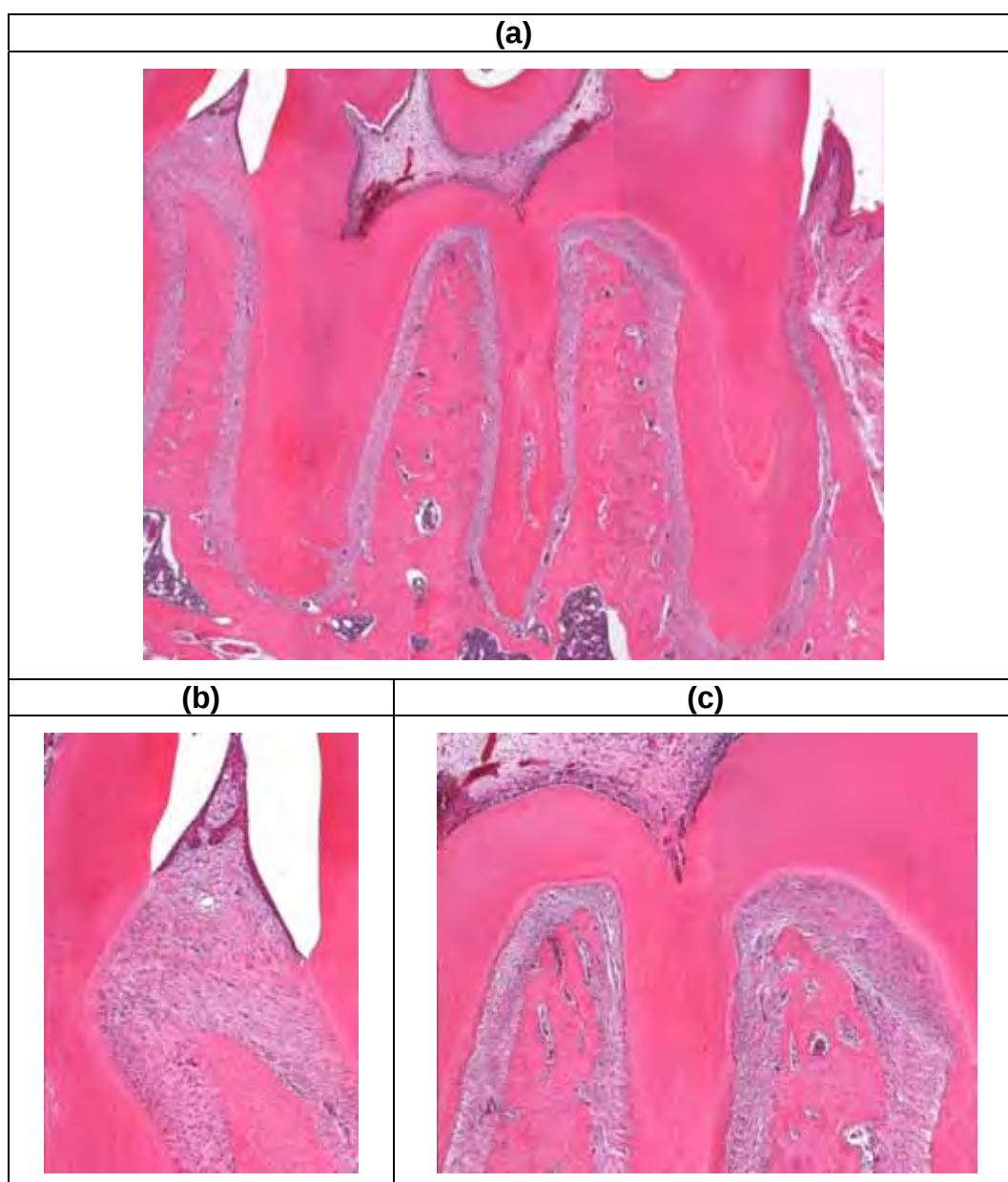


Figura 14 – Laser 14 dias. (a) Fotomicrografia panorâmica da região do 1º molar inferior direito; (b) Região interdental entre os 1º e 2º molares inferiores direito; (c) Região de furca do 1º molar inferior direito. HE, aumento original 50x e 100x.

5.1.2.3 Grupo Diabetes

Na região interdental os espécimes exibiam perda das paredes ósseas do periodonto. A gengiva apresentava-se revestida por epitélio pavimentoso estratificado com presença de acantose e exocitose, enquanto que a lâmina própria era constituída por tecido conjuntivo ricamente celularizado e vascularizado, exibindo difuso infiltrado de células inflamatórias, predominantemente mononucleares.

Na região de furca em alguns espécimes era observada presença de delicadas trabéculas ósseas imaturas, enquanto que na maioria dos espécimes era notória a acentuada destruição de tecido ósseo, necrose do tecido pulpar, reabsorção radicular além de proliferação e invaginação de epitélio juncional no elemento dentário envolvido na movimentação ortodôntica (Figuras 15 e 16).

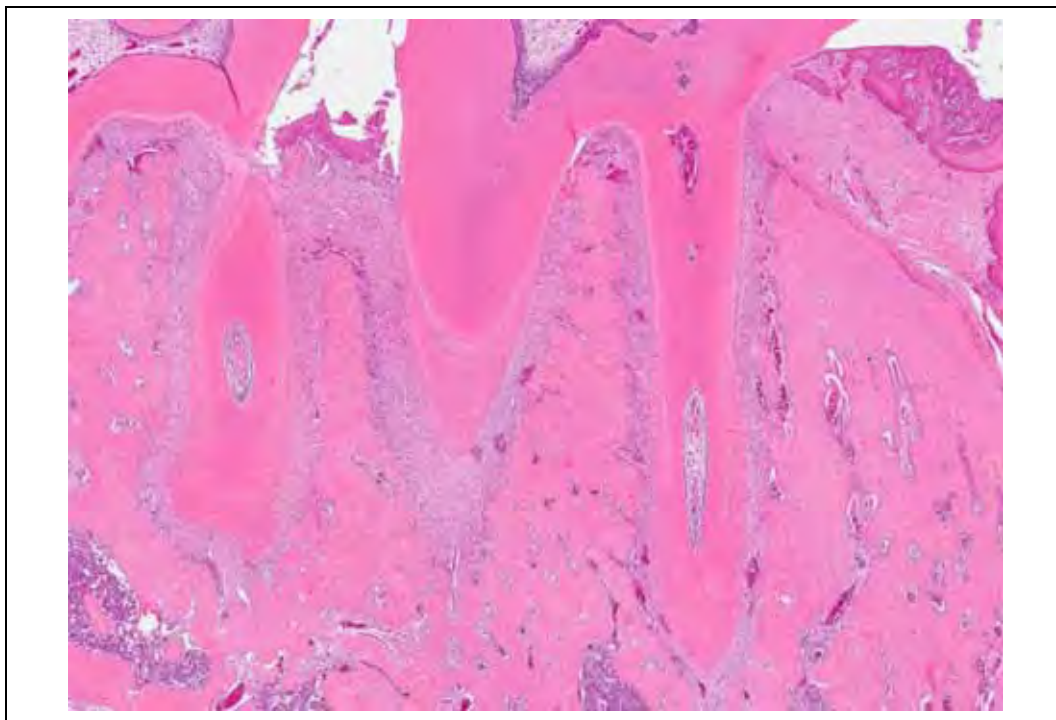


Figura 15 – Diabetes 14 dias. Fotomicrografia panorâmica da região do 1º molar inferior direito. HE, aumento original 50x.

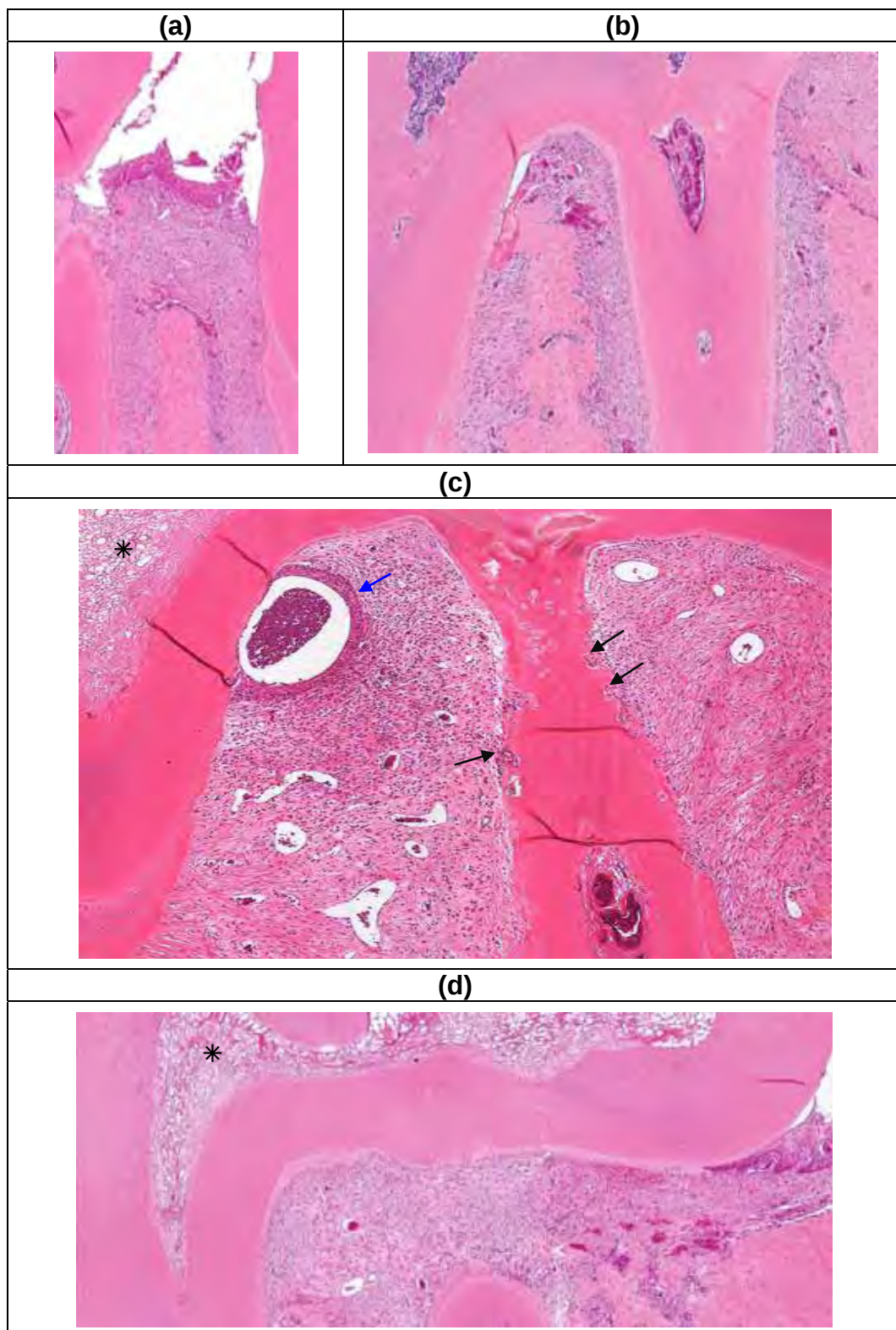


Figura 16 – Diabetes 14 dias. (a) Região interdental entre os 1º e 2º molares inferiores direito; (b,c,d) Região de furca do 1º molar inferior direito; (*) Necrose do tecido pulpar; (setas pretas) Reabsorção radicular; (seta azul) Reabsorção do tecido ósseo e invaginação do epitélio juncional. HE aumento original 100x.

5.1.2.4 Grupo Diabetes-Laser

Na região interdental, os espécimes exibiam gengiva revestida por epitélio pavimentoso estratificado, com acantose e exocitose. A lâmina própria apresentava-se constituída por tecido conjuntivo com moderado infiltrado inflamatório de células mononucleares.

Na região de furca o ligamento periodontal apresentava-se com numerosos vasos sanguíneos de tamanho pequeno a médio e dilatados em alguns espécimes, áreas de tecido de granulação também foram evidenciadas (Figuras 17 e 18).

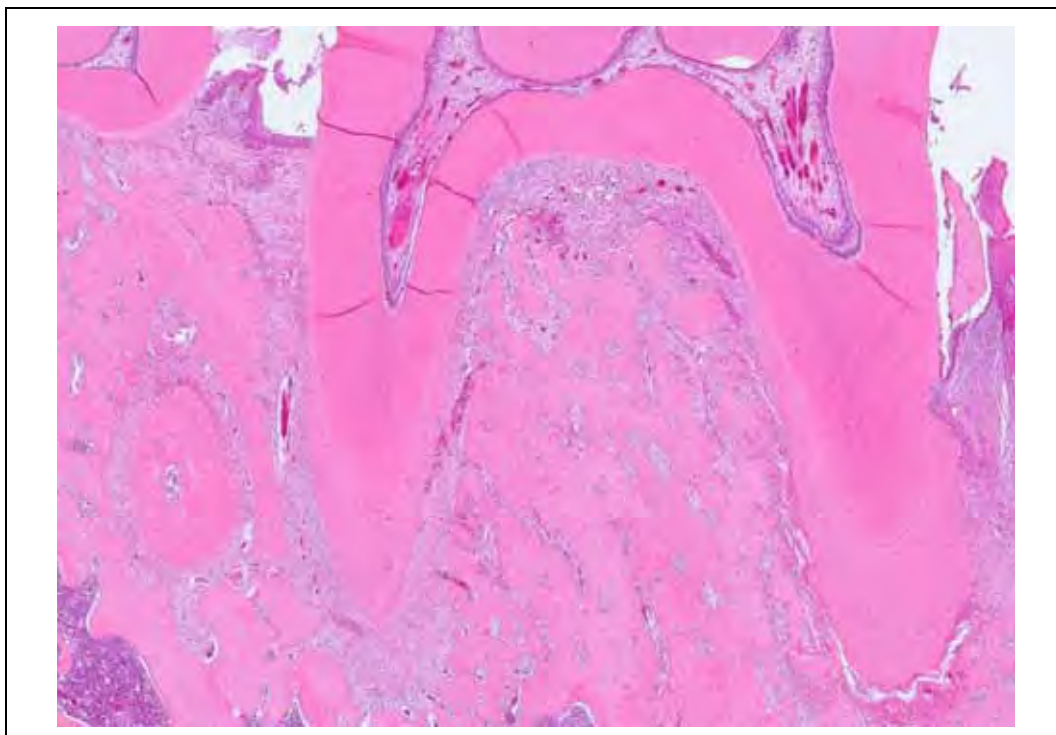


Figura 17 – Diabetes-Laser 14 dias. Fotomicrografia panorâmica da região do 1º molar inferior direito. HE, aumento original de 50x.

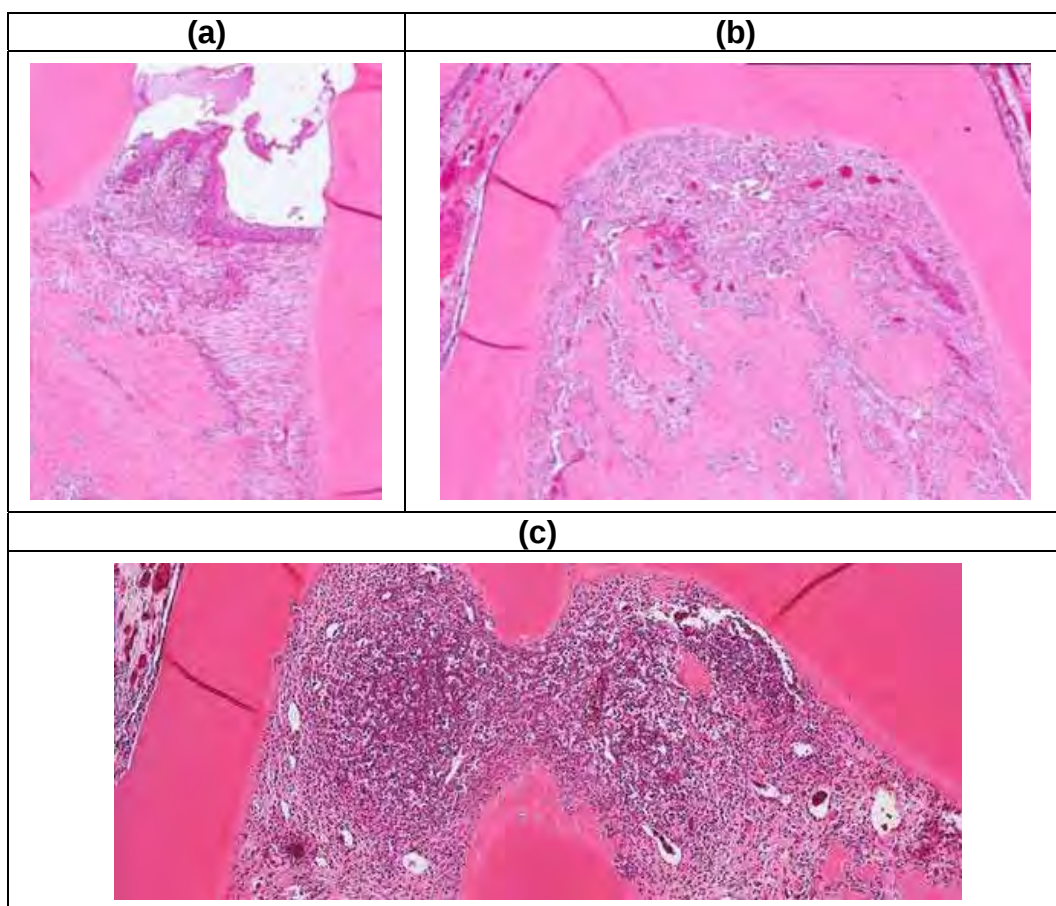


Figura 18 – Diabetes-Laser 14 dias. (a) Região interdental entre os 1º e 2º molares inferiores direito; (b) Região de furca do 1º molar inferior direito. (c) Tecido de granulação na área de furca. HE, aumento original 100x.

5.1.3 Período de 21 dias

5.1.3.1 Grupo Controle

Na região interdental, os espécimes exibiam reabsorções das paredes ósseas do periodonto de sustentação devido à atividade osteoclástica, desenvolvendo bolsas periodontais na vertical e horizontal de tamanhos variados. O epitélio juncional mostrava-se hiperplásico exibindo alongamento e anastomose de suas projeções e degeneração hidrópica. A lâmina própria era constituída, predominantemente, por tecido conjuntivo frouxo com moderado infiltrado de células inflamatórias

e numerosos vasos sanguíneos. As fibras colágenas do ligamento periodontal da região interdental foram destruídas, permanecendo as fibras oblíquas e periapicais.

Na região de furca notava-se que alguns espécimes exibiam tecido de granulação, principalmente, em regiões com comprometimento, além de evidentes reabsorções radiculares externas (Figura 19).

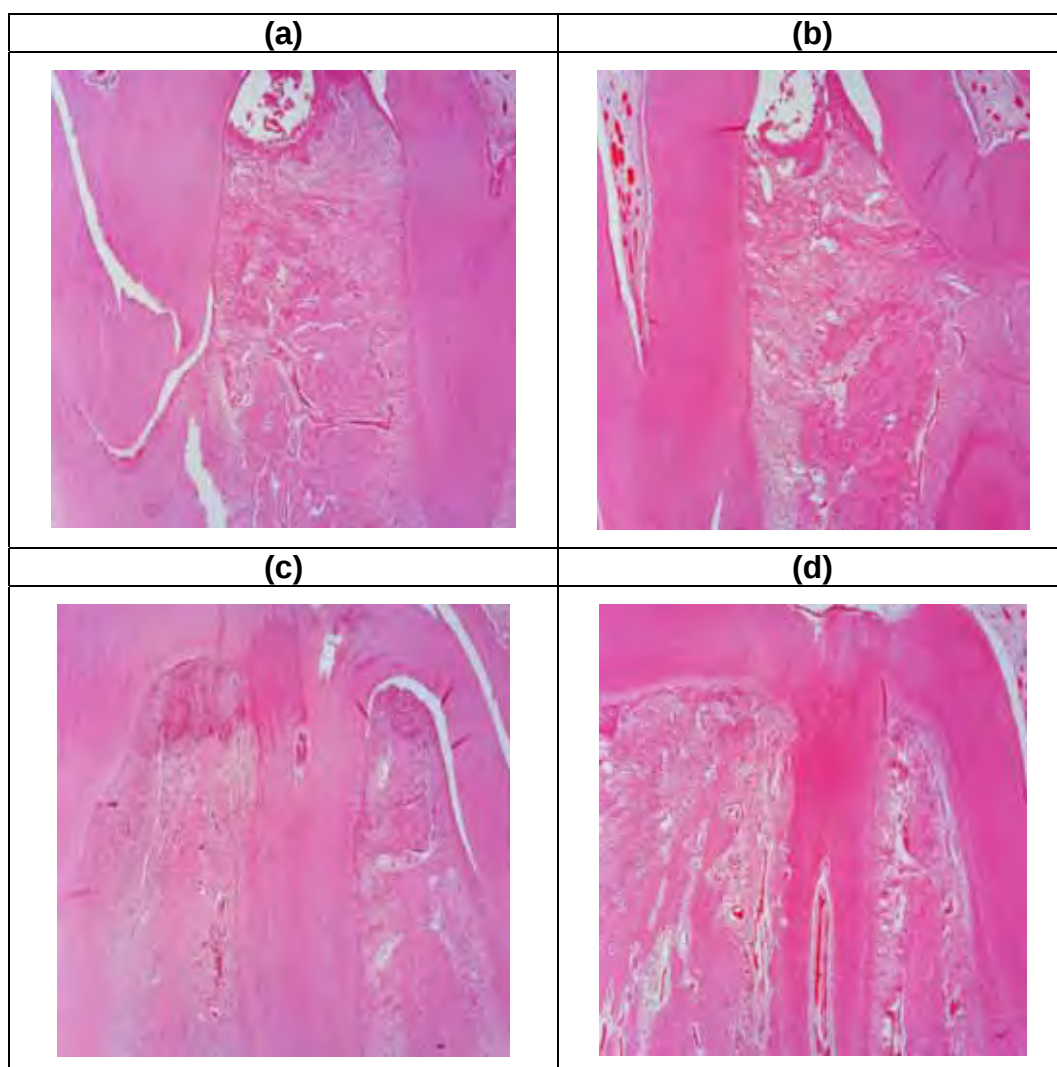


Figura 19 – Controle 21 dias. (a, b) Fotomicrografias da região interdental, entre os 1º e 2º molares inferiores direito. (c, d) Região de furca do 1º molar inferior direito. HE, aumento original 100x.

5.1.3.2 Grupo Laser

Na região interdental os espécimes exibiam gengiva de aspecto filiforme revestida por epitélio estratificado não queratinizado, exibindo poucas camadas de células, além de projeções de cristas epiteliais interligando entre si. A lâmina própria era composta por tecido conjuntivo frouxo, exibindo discreto infiltrado de células inflamatórias mononucleares e predominância de vasos sanguíneos de pequeno calibre. A maioria dos espécimes exibia espaço biológico preservado, sendo composto por tecido conjuntivo e fibras colágenas com arranjo irregular.

Na região de furca houve formação contínua de tecido ósseo assim como na região interdental, sem que houvesse quaisquer prejuízos na histomorfologia do periodonto de sustentação. O ligamento periodontal, apresentava espessamento contínuo em todo o contorno do dente envolvido na movimentação ortodôntica e era constituído por tecido conjuntivo bem celularizado e vascularizado, com infiltrado de raras células inflamatórias mononucleares (Figuras 20 e 21).

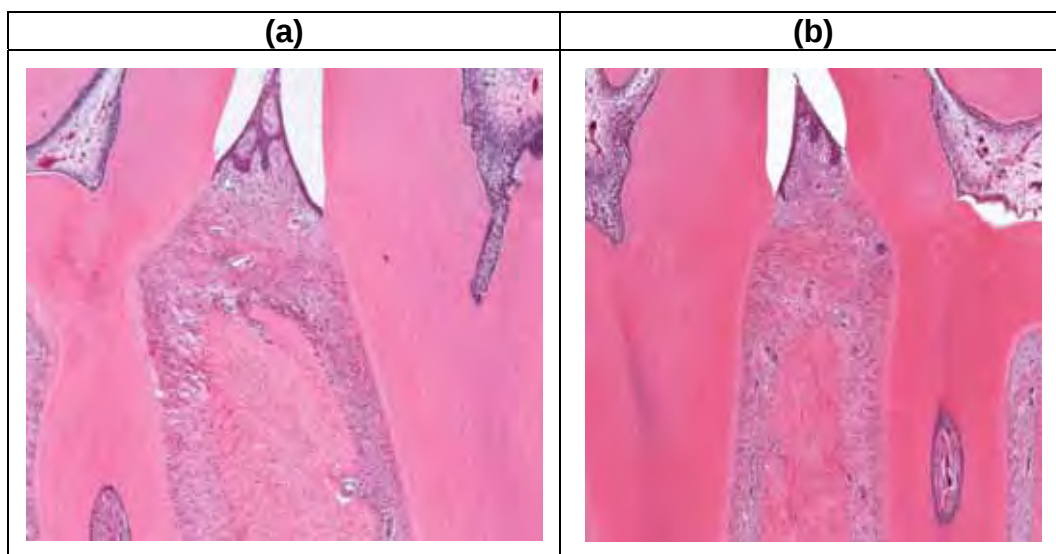


Figura 20 – Laser 21 dias. (a, b) Fotomicrografias da região interdental entre os 1º e 2º molares inferiores direito. HE, aumento original 100x.

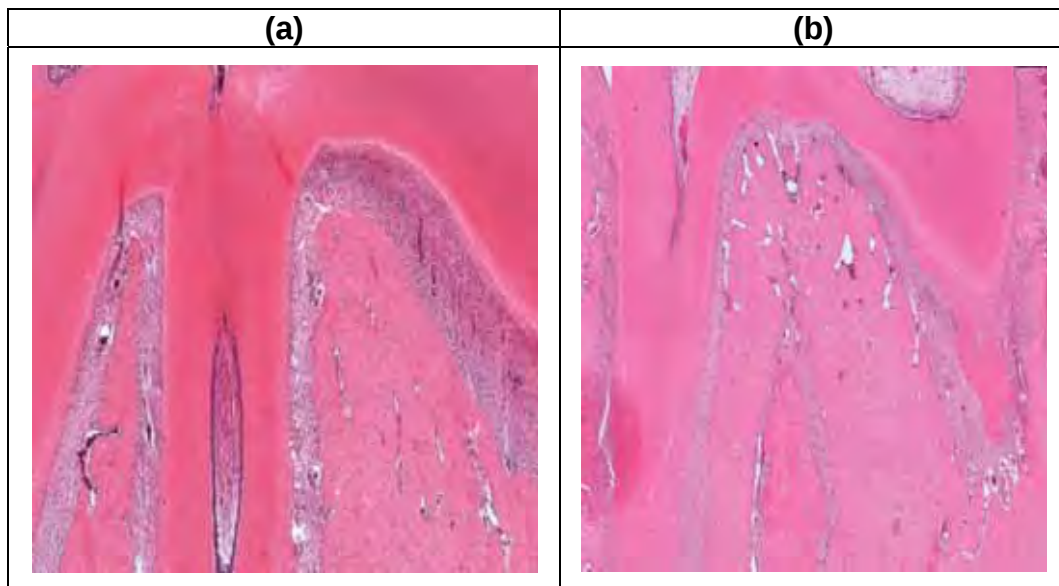


Figura 21 – Laser 21 dias. (a, b) Fotomicrografias da região de furca do 1º molar inferior direito. HE, aumento original 100x.

5.1.3.3 Grupo Diabetes

Os aspectos histológicos eram semelhantes ao grupo controle, entretanto notava-se que, alguns espécimes, exibiam extensas perdas ósseas da parede alveolar na região interdental.

Na região de furca houve discreta reabsorção óssea e evidentes reabsorções radiculares (Figura 22).

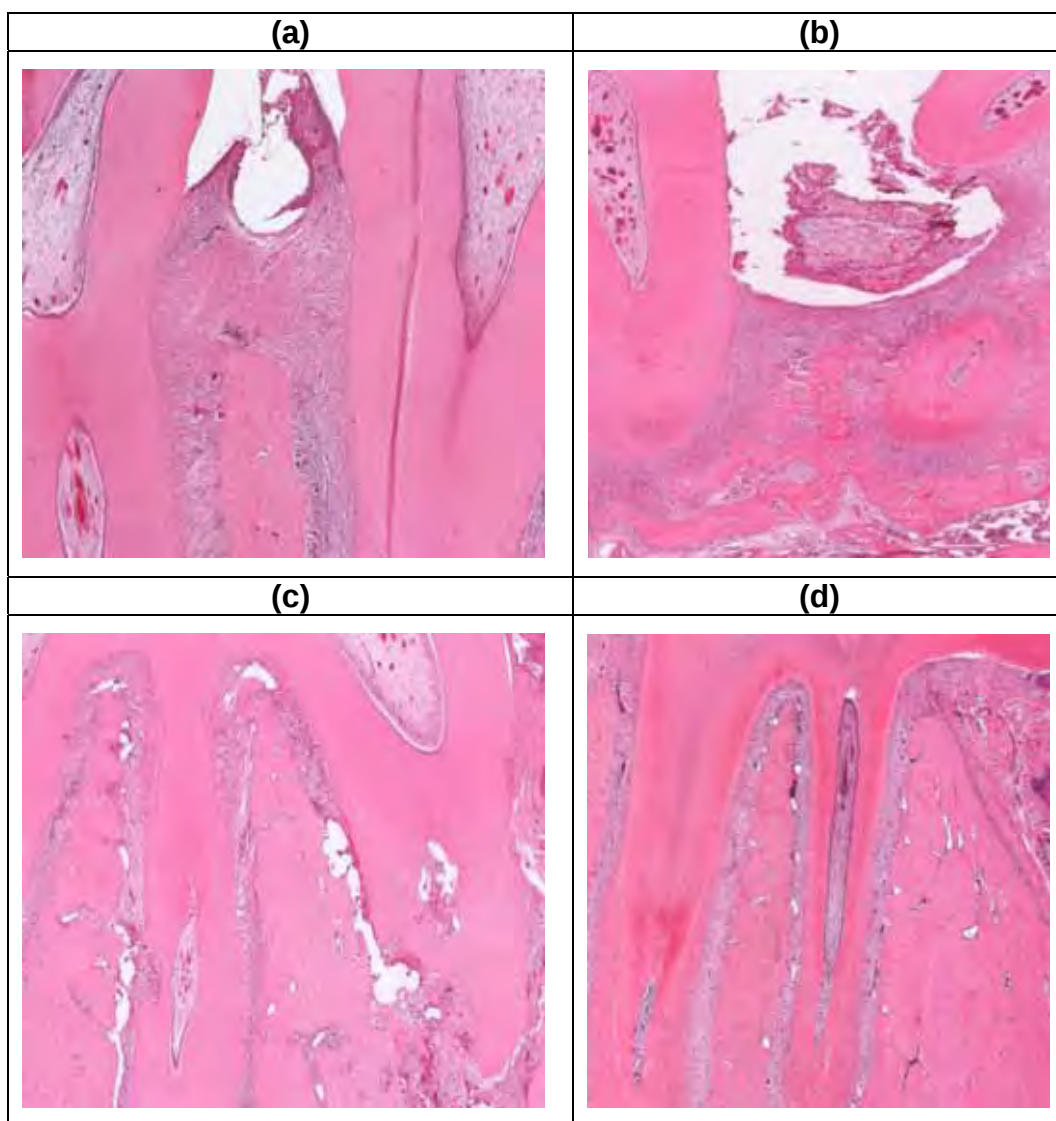


Figura 22 - Diabetes. 21 dias. (a, b) Fotomicrografias da região interdental, entre os 1^o e 2^o molares inferiores direito; (c, d) Região de furca do 1^o molar inferior direito. HE, aumento original 100x.

5.1.3.4 Grupo Diabetes-Laser

Na região interdental os espécimes exibiam gengiva de aspecto filiforme revestida por epitélio estratificado não queratinizado e preservação do espaço biológico. A lâmina própria era composta por tecido conjuntivo frouxo, exibindo infiltrado de raras células inflamatórias mononucleares.

A maioria dos espécimes exibia preservação da região de furca. Em adição, notava-se espessamento contínuo do ligamento periodontal em todo o contorno do dente envolvido na movimentação ortodôntica e dos dentes adjacentes (Figura 23).

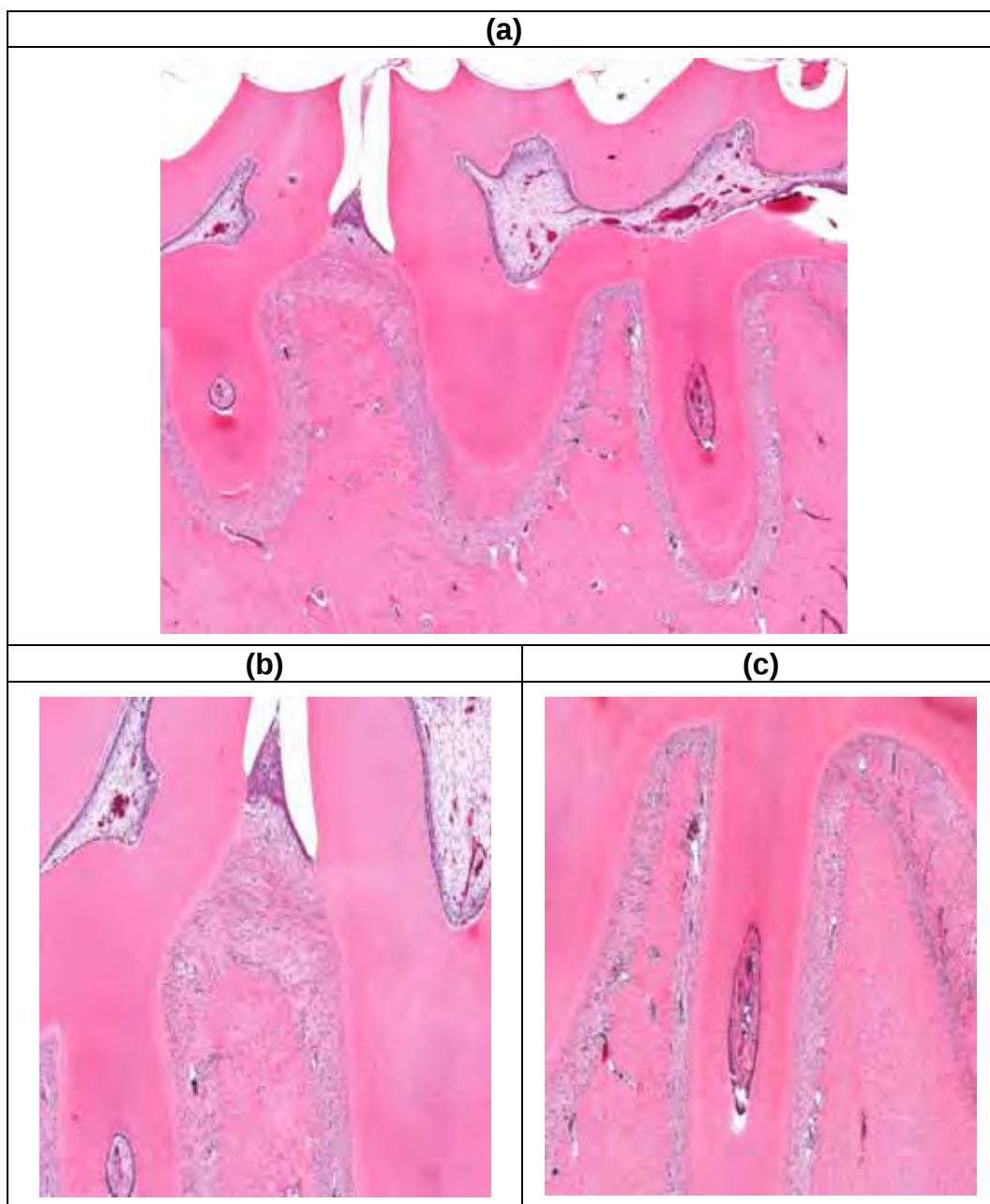


Figura 23 – Diabetes-Laser 21 dias. (a) Fotomicrografia panorâmica exibindo preservação do periodonto de sustentação entre os 1º e 2º molares inferiores direito; (b) Formação de tecido ósseo na região interdental; (c) Região de furca do 1º molar inferior direito. HE, aumento original 50x e 100x.

5.2 Análise Imuno-histoquímica

As figuras 24a e 25a representam a imunomarcacão de células para os anticorpos OPG e RANK-L, respectivamente, de todos os grupos e períodos estudados (7,14 e 21 dias).

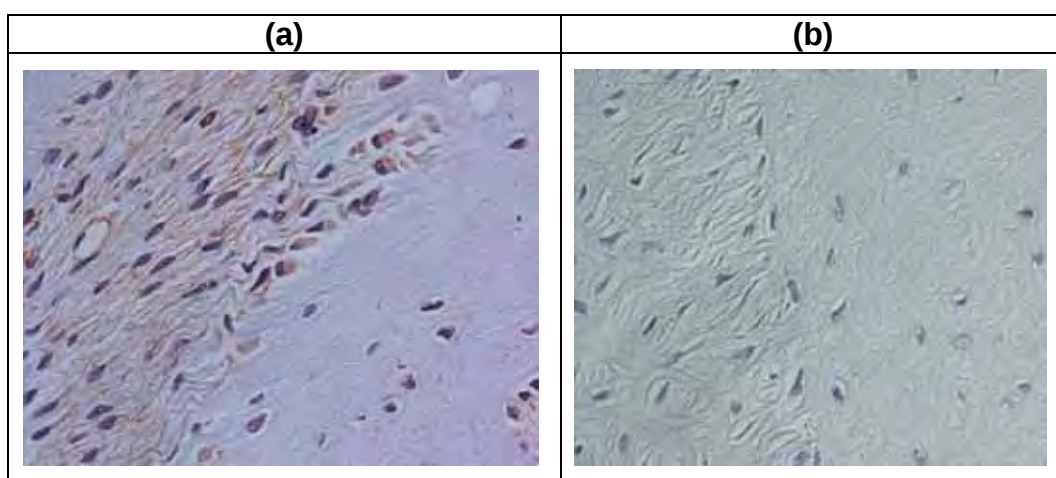


Figura 24 - Fotomicrografia da imuno-histoquímica. (a) Osteoblastos imunorreativos para OPG, (b) Controle negativo. Osteoblastos localizados na face mesial do septo interradicular do tecido ósseo alveolar do 1º molar inferior direito. Aumento original de 400x.

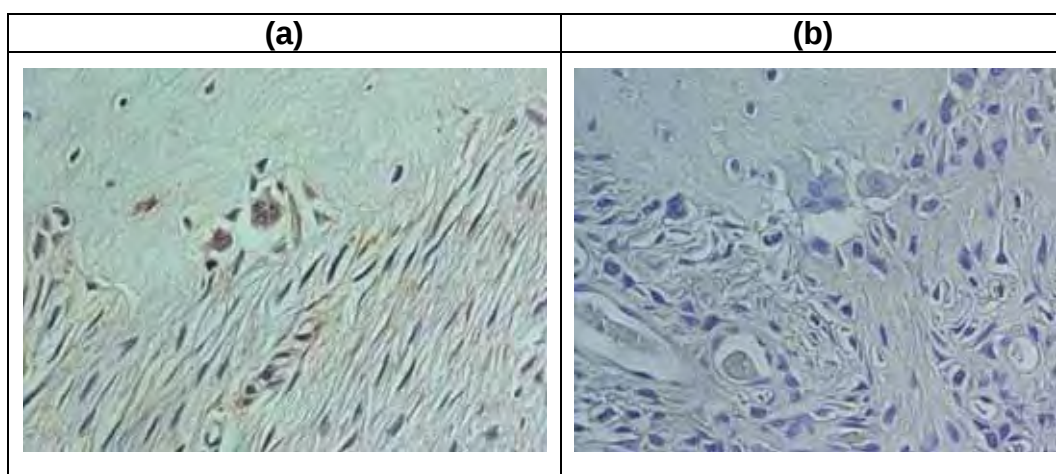


Figura 25 - Fotomicrografia da imuno-histoquímica. (a) Osteoclastos imunorreativos para RANK-L, (b) Controle negativo. Osteoclastos localizados na face distal do septo interradicular do tecido ósseo alveolar do 1º molar inferior direito. Aumento original de 400x.

5.3 Análise Histomorfométrica

Para análise histomorfométrica, realizou-se a mensuração de células imunorreativas para OPG e RANK-L em 5 campos nas faces mesial e distal do septo interradicular e face mesial do septo interdentário do osso alveolar do primeiro molar inferior direito nos períodos de 7, 14 e 21 dias de movimentação ortodôntica nos animais de todos os grupos estudados. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, utilizando o teste One Way ANOVA e teste de TUKEY.

Tabela 1 – Dados histomorfométricos do número de osteoblastos imunorreativos para OPG em todos os grupos e períodos estudados. Valores expressos por Média $\pm$ DP (Desvio Padrão), (n=3)

GRUPOS	MÉDIA $\pm$ DP		
	7 Dias	14 Dias	21 Dias
Controle	8,40 $\pm$ 0,26	12,33 $\pm$ 0,20	9,93 $\pm$ 0,45
Laser	10,93 $\pm$ 0,05	12,43 $\pm$ 0,15	11,03 $\pm$ 0,47
Diabetes	8,33 $\pm$ 0,20	10,47 $\pm$ 0,40	9,16 $\pm$ 0,49
Diabetes-Laser	11,70 $\pm$ 0,34	12,13 $\pm$ 0,86	11,23 $\pm$ 0,11

Tabela 2 – Análise de variância (ANOVA) e teste de TUKEY dos resultados histomorfométricos, referentes a osteoblastos imunorreativos para OPG, em todos os grupos e períodos estudados. Nível de significância estatística ($P < 0,05$)

GRUPOS	NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (P)		
	7 Dias (*)	14 Dias (*)	21 Dias (*)
C x D (**)	$P > 0,05$	$P < 0,01$	$P > 0,05$
C x L (***, *)	$P < 0,0001$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
C x D-L (***, *)	$P < 0,0001$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
D x L (***, **, *)	$P < 0,0001$	$P < 0,01$	$P < 0,01$
D x D-L (***, *, **)	$P < 0,0001$	$P < 0,05$	$P < 0,01$
L x D-L (*)	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$

C: Controle; L: Laser; D: Diabetes; D-L: Diabetes-Laser. O número de asterisco está diretamente proporcional ao nível de significância estatística (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,0001$; Não significante = $P > 0,05$). As cores azul, vermelha e verde referem-se respectivamente aos períodos de 7, 14 e 21 dias.

Os resultados estatísticos da análise histomorfométrica referentes ao anticorpo OPG estão demonstrados no gráfico a seguir:

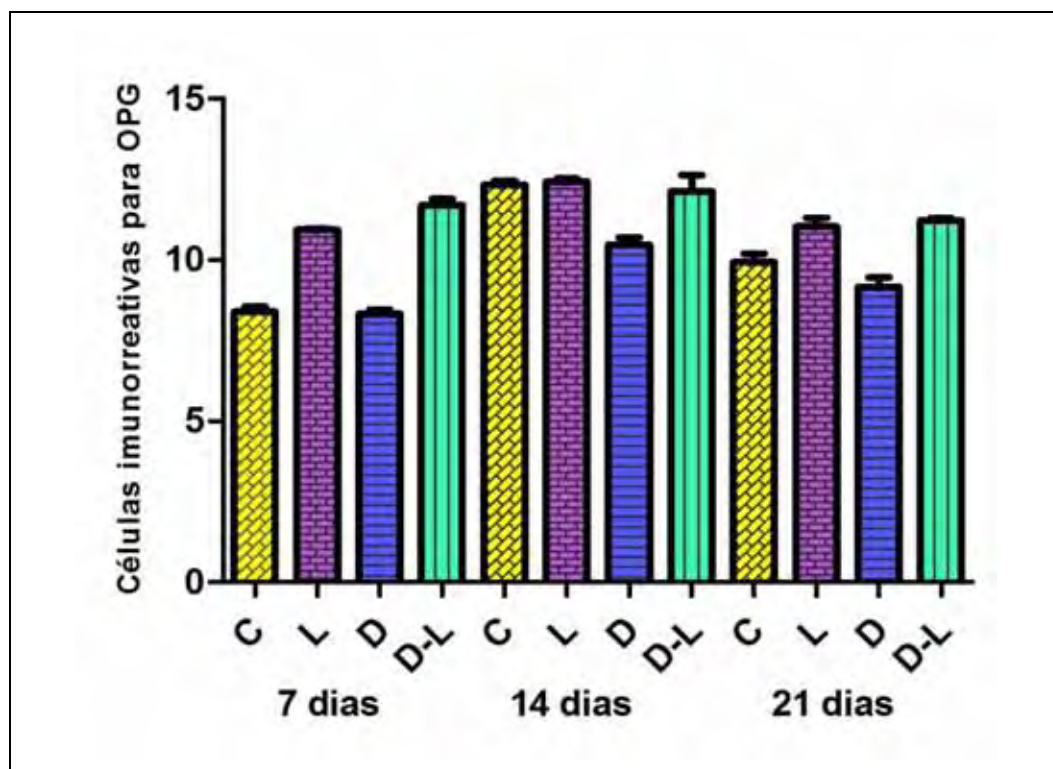


Figura 26 - Representação gráfica dos valores médios do número de osteoblastos imuno-reativos para OPG, em todos os grupos e períodos estudados. C: Controle; L: Laser; D: Diabetes; D-L: Diabetes-Laser.

Tabela 3 – Dados histomorfométricos do número de osteoclastos imunorreativos para RANK-L, em todos os grupos e períodos estudados. Valores expressos por Média $\pm$ DP (Desvio Padrão), (n=3)

GRUPOS	MÉDIA $\pm$ DP		
	7 Dias	14 Dias	21 Dias
Controle	1,30 $\pm$ 0,34	0,83 $\pm$ 0,15	0,80 $\pm$ 0,17
Laser	0,66 $\pm$ 0,20	0,76 $\pm$ 0,41	0,43 $\pm$ 0,30
Diabetes	0,80 $\pm$ 0,36	0,73 $\pm$ 0,60	0,73 $\pm$ 0,35
Diabetes-Laser	1,10 $\pm$ 0,45	1,20 $\pm$ 0,17	0,56 $\pm$ 0,46

Tabela 4 – Análise de variância (ANOVA) e teste de TUKEY dos resultados histomorfométricos, referentes a osteoclastos imunorreativos para RANK-L, em todos os grupos e períodos estudados. Nível de significância estatística ($P < 0,05$)

GRUPOS	NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (P)		
	7 Dias (*)	14 Dias (*)	21 Dias (*)
C x D	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
C x L	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
C x D-L	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
D x L	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
D x D-L	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
L x D-L	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$

C: Controle; L: Laser; D: Diabetes; D-L: Diabetes–Laser. O número de asterisco está diretamente proporcional ao nível de significância estatística (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,0001$; Não significativa = $P > 0,05$). As cores azul, vermelha e verde referem-se respectivamente aos períodos de 7, 14 e 21 dias.

Os resultados estatísticos da análise histomorfométrica referentes ao anticorpo RANK-L estão demonstrados no gráfico a seguir:

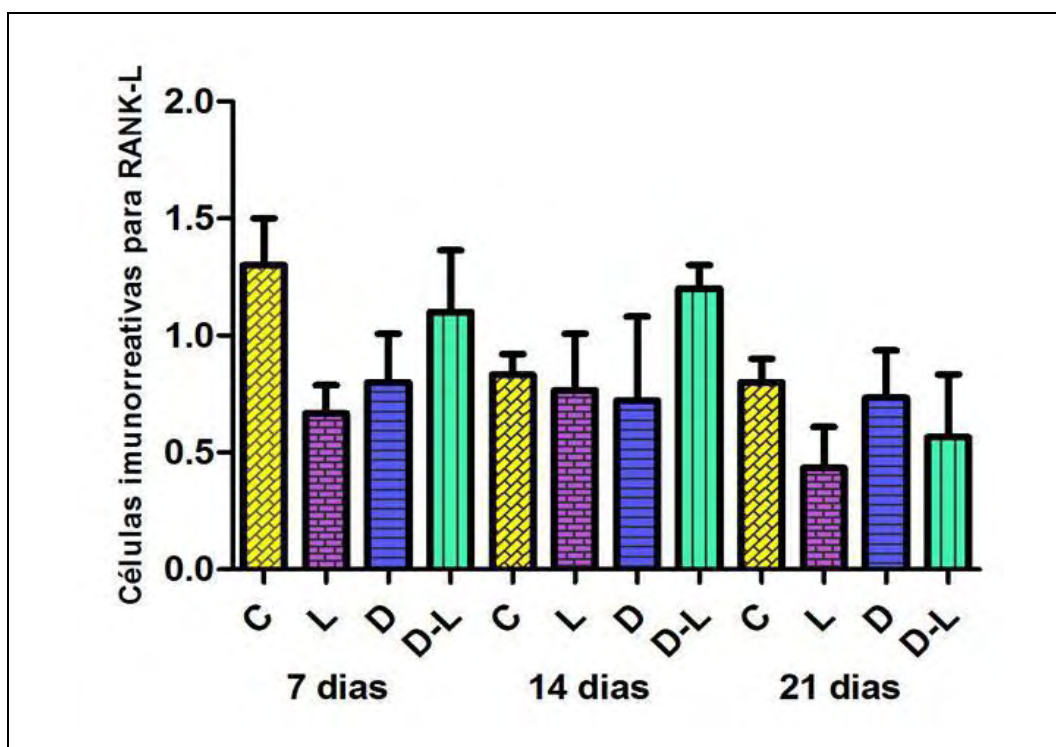


Figura 27 - Representação gráfica dos valores médios do número de osteoclastos imuno-reativos para RANK-L, em todos os grupos e períodos estudados. C: Controle; L: Laser; D: Diabetes; D-L: Diabetes-Laser.

6 DISCUSSÃO

A pesquisa desenvolvida foi proposta com a finalidade de compreender melhor as questões pertinentes ao movimento ortodôntico em ratos diabéticos e a ação do laser de baixa potência no processo de remodelação óssea alveolar, uma vez que há carência de estudos relacionados na literatura pesquisada.

Algumas formas de indução experimental do DM foram descritas na literatura, tais como: infecções virais, pancreatectomia parcial, uso de hormônios anti-insulínicos, uso excessivo de hidrocortisona (hormônio adenocorticotrófico) e uso de agentes químicos beta-citotóxicos, entre eles os mais empregados são a aloxana e a estreptozotocina (Tominaga, 2007; Leme et al., 2010; Shankaracharya et al., 2012). Neste estudo, optou-se pela aloxana, por ser um potente agente diabetogênico capaz de promover destruição seletiva das células β do pâncreas, reduzindo experimentalmente a secreção de insulina.

Com base na literatura, utilizou-se a dose de 40 mg/Kg da aloxana, garantindo a indução e a manutenção do quadro diabético por um longo período, além de proporcionar boas condições de sobrevivência para o animal. Quanto às vias de administração da aloxana, as vias subcutânea e intraperitoneal são consideradas satisfatórias no rato, porém a via endovenosa tem sido a de escolha da maioria dos pesquisadores, obtendo resultados satisfatórios pela sua efetividade na citotoxicidade das células β pancreáticas (Luc Bensch et al., 2003; Amorim et al., 2008; Li Xin et al., 2010). Destarte, foi administrado a aloxana por via endovenosa, permitindo a obtenção de excelentes resultados, visto que, 95% dos animais tornaram-se portadores de DM. A referida droga e os procedimentos de indução utilizados neste estudo estão de acordo

com as metodologias descritas na literatura (Lerco et al., 2003; Feng, 2005; Sakaguchi, 2007; Tominaga, 2007).

Ademais, autores descrevem o mecanismo de ação da aloxana, onde este promove discreta redução glicêmica após 30 minutos de sua aplicação como resultado de estimulação da secreção de insulina e consequente aumento da insulinemia. Após 60 minutos da aplicação ocorre hiperglicemia decorrente de decréscimo da insulinemia, persistindo por aproximadamente 4 horas, ocorrendo nesta fase as primeiras alterações morfológicas das células β do pâncreas. Em seguida, no período de 4 a 8 horas, ocorre excessivo aumento da insulinemia, como consequência de ruptura da membrana celular. Posteriormente, segue a hiperglicemia, que ocorre de forma gradativa entre 9 a 144 horas, estabilizando-se em seguida de forma definitiva. Nesta fase ocorre a destruição da maioria das células β -pancreáticas (Szkudelki, 2001; Bensch et al., 2004; Lenzen, 2008; Leme et al., 2010), tornando-se irreversível o processo de reparo deste órgão. Diante desta dinâmica, já estabelecida na literatura, realizou-se a mensuração da glicemia 7 dias após a indução do diabetes para comprovar sua estabilização.

As alterações morfológicas do pâncreas, em questão, são de fundamental importância para o desenvolvimento do quadro diabético no animal, que em longo prazo, incluem redução no peso, polifagia, polidipsia, poliúria, alterações no sistema imunológico entre outras. Em relação à evolução clínica dos animais diabéticos analisada neste estudo, foram observadas alterações características muito similares ao diabetes humano, que contrastam completamente da evolução de animais normoglicêmicos, estes se apresentaram, ao longo do experimento, em bom estado geral, ativos, com apetite, tônus e reflexos conservados, ganho de peso progressivo, manutenção da ingestão hídrica e alimentar, dentro dos padrões de normalidade para a espécie e em conformidade com outros trabalhos (Luc Bensch et al., 2003; Duarte et al., 2007; Brekke et al., 1998). As complicações gerais apresentadas nos animais

diabéticos caracterizavam-se por fraqueza, prostração, poliúria, polifagia, polidipsia, evacuação frequente, alteração na textura da pelagem e distensão abdominal. Esses achados clínicos também foram observados nos estudos de Almeida et al., 2008; Amorim et al., 2009; Li Xin et al., 2010; Shankaracharya et al., 2012.

Os níveis glicêmicos dos ratos diabéticos, obtidos em nosso estudo, foram acima de 300 mg/dL, de modo que 18 animais apresentavam valores entre 301 a 400 mg/dL, 22 de 401 a 500 mg/dL, 12 de 501 a 600 mg/dL e 3 acima de 600 mg/dL. Ressalva-se que 5 animais morreram devido aos graves efeitos colaterais do diabetes. Considerando estes achados, a literatura confirma que a variação de glicemia em ratos diabéticos, induzidos por aloxana, é de 300 a 572 mg/dL (Sonis et al., 1985; Soares et al., 2000; Lu et al., 2003; Bensch et al., 2004). É importante ressaltar que o objetivo em utilizar os animais diabéticos descompensados foi tentar qualificar e quantificar as alterações do periodonto presentes neste distúrbio metabólico e criar um modelo experimental para indivíduos diabéticos nas mesmas condições. Salientamos, também, que indivíduos diabéticos apresentam distúrbios metabólicos, causando significativas alterações teciduais no periodonto, as quais devem ser consideradas no planejamento do tratamento ortodôntico.

Sabe-se que muitas complicações crônicas, como microangiopatia e macroangiopatia, dos indivíduos portadores de DM estão relacionadas às alterações do metabolismo ósseo, prejudicando o processo de neoformação e reabsorção. Ademais, a ausência do gene de expressão, que regula a diferenciação osteoblástica, tem interferido nos processos de reparação óssea de pacientes diabéticos (Robbins, 2000; Verhaeghe et al., 1996).

Segundo Lu et al. (2003), a insuficiência de insulina ou a sua incapacidade de ação frente a transferência de glicose do plasma para o citoplasma das células, caracteriza alterações do metabolismo de

carboidratos, gorduras e proteínas, resultando nas alterações de permeabilidade da membrana celular, no transporte de glicose e de aminoácidos e no fluxo de potássio (Sonis et al., 1985; Lu et al., 2003; Besnch et al., 2004). Além disso, esse desequilíbrio glicêmico no organismo altera a modulação do crescimento esquelético normal, uma vez que exerce efeitos negativos sobre o metabolismo ósseo. Esta alteração interfere na regulação do processo de reabsorção, síntese de matriz osteóide e mineralização óssea (Melgaço 2002; Madeiro et al., 2005).

Estudos demonstraram que a diminuição da resistência estrutural óssea está diretamente relacionada com as alterações da síntese de proteoglicanas e diminuição da atividade osteoblástica, repercutindo em prejuízos na produção da matriz óssea e no retardo da formação dos tecidos ósseos, ou seja, no desequilíbrio da formação de osteóide e na homeostase mineral óssea (Margonar et al., 2003; Heap et al., 2004; Thrailkill et al., 2005; Abassy et al., 2010). O grau de intensidade dessas alterações pode provocar quadros agudos de osteopenia e, conseqüentemente, osteoporose (Verhaeghe et al., 1996; Heap et al., 2004; Thrailkill et al., 2005). Outras evidências relevantes que poderiam justificar o retardo na reparação óssea seriam as alterações causadas pelos produtos finais da glicolisação avançada (*Advanced Glycolization Endproducts*-AGEs), são compostos derivados da glicose acumulada nos tecidos e no plasma de diabéticos, sendo moléculas estáveis que não se degradam mesmo quando os níveis de glicemia retornam à normalidade. Os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados à capacidade destes compostos de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas, por meio da formação de radicais livres e ligações cruzadas com proteínas, além das interações com receptores celulares. Além disso, os AGEs promovem estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e

aumento da expressão de mediadores inflamatórios (Fiorellini et al., 1999; Gregg et al., 2002; Gugliucci, 2000).

Neste estudo, verificamos que o nível glicêmico dos ratos diabéticos foi elevado, sendo potencializado pelo estresse do animal durante as várias aplicações da laserterapia. Sugerimos, ainda, a hipótese de que havia presença excessiva de AGEs nos tecidos periodontais, em conjunto com a força ortodôntica, potencializando as atividades osteoclásticas, a produção de collagenase e o aumento da intensidade do processo inflamatório. Isto poderia justificar a progressão e severidade da destruição dos tecidos periodontais. Esses fenômenos foram abordados nos estudos realizados por Fiorellini et al., (1999); Gugliucci (2000); Hildebrand et al., (2000); Gregg et al., (2002); Takada et al., (2004); Nakajima et al., (2006).

De acordo com Boyle et al. (2003), as células envolvidas na remodelação óssea são os osteoclastos e osteoblastos, sendo que o balanço entre ativação e apoptose destas células tem papel fundamental no processo de osteoclastogênese e na regulação da remodelação óssea.

A descoberta e caracterização do sistema RANK-RANK-L e OPG têm mudado os conceitos relativos ao metabolismo ósseo, levando a um melhor entendimento da patogênese das doenças ósseas metabólicas e alavancando novas estratégias terapêuticas (Menezes et al., 2006; Andrade et al., 2008). O RANKL é uma proteína relacionada com o processo de reabsorção óssea. Sua interação com o RANK, um receptor expresso na superfície de pré-osteoclastos, promove a sua diferenciação e ativação em osteoclastos. A osteoprotegerina (OPG) é uma citocina também pertencente à família do TNF que age como receptor solúvel para o RANKL, prevenindo que este que ligue ao RANK, bloqueando assim a diferenciação de osteoclastos, e consequentemente a reabsorção óssea (Jilka, 2003; Miller et al., 2007; McCormick, 2007; Gallagher, 2008).

Diversos estudos avaliam o papel do sistema OPG/RANKL na remodelação óssea, porém, a metodologia empregada por estes trabalhos é variada devido às pesquisas serem realizadas em animais e humanos (Seck et al., 2001; Pulsatelli et al., 2004; Liu et al., 2005; Duarte et al., 2007; Zhang et al., 2007; Jorgensen et al., 2010). Neste estudo, avaliamos a remodelação óssea alveolar durante a movimentação ortodôntica em ratos diabéticos, objetivando averiguar o comportamento dos tecidos periodontais após radiação laser de baixa potência.

As citocinas e os fatores de crescimento (ILs-1,6,11 TNF) liberados nas regiões que sofrem estímulos, sejam eles infecciosos ou mecânicos, promovem diferenciação e maturação de osteoclastos. Este fenômeno poder ocorrer por meio do estímulo direto de células mesenquimais indiferenciadas ou por um mecanismo parácrino, onde as células presentes expressam ou liberam os receptores RANK, RANK-L e OPG que induzem a osteoclastogênese (Kumar et al., 2005). Em nossos resultados, demonstramos que as atividades osteoblásticas e osteoclásticas nas áreas de tensão e pressão dos ligamentos periodontais, respectivamente, foram concomitantes, promovendo formação e reabsorção óssea durante a movimentação ortodôntica, nos períodos de 7, 14 e 21 dias. Constatamos, ainda, que houve significância estatística no aumento do número de osteoblastos imunorreativos para OPG no período de 14 dias, diminuindo aos 21 dias, nos grupos C, L e D. Estes fatos demonstraram a evolução do processo de movimentação ortodôntica até período de 14 dias e estabilização deste mesmo processo em 21 dias, outra hipótese seria a inibição do metabolismo celular devido à produção excessiva de produção de ATP no interior da mitocôndria, induzida pela irradiação laser. De acordo com Miloro et al., (2007); Costardi et al., (2008), esta radiação intensifica a formação de um gradiente de fóton eletroquímico transmembrana na mitocôndria, promove liberação de cálcio da mitocôndria no citoplasma e, conseqüentemente,

estimula a mitose e a proliferação celular. Todavia, altas ou frequentes doses aumentam excessivamente a liberação de cálcio, causando hiperatividade das bombas de cálcio ATPase e estabilização do pool de ATP da célula, inibindo o metabolismo celular.

Verificamos, também, que os ratos submetidos à radiação laser (L e D-L) apresentavam maior número de osteoblastos imunorreativos para OPG quando comparados com os ratos dos grupos C e D, comprovando a efetiva ação bioestimuladora da radiação laser nos tecidos periodontais, submetidos ao tratamento ortodôntico. Ressalta-se, também, que o aumento do número de osteoblastos imunorreativos para OPG apresentava significância estatística, principalmente, entre os grupos D e D-L, em todos os períodos de observação.

Apesar de não haver significância estatística do número de osteoclastos imunorreativos para RANK-L nos grupos e períodos estudados, verificamos que a quantidade de osteoclastos imunorreativos era inversamente proporcional a quantidade de osteoblastos imunorreativos, confirmando a dinâmica fisiopatológica do processo de remodelação óssea alveolar. Contrário de nossos resultados, Amorim et al., (2008) relataram que não houve balanço na expressão RANK-RANKL-OPG associado ao diabetes, firmando o fato da doença diabetes contribuir para o retardo do processo de reparação.

Em adição, a radiação laser aplicada no periodonto de sustentação favoreceu os processos de neoformação e reabsorção óssea, superando os resultados dos aspectos histológicos dos animais dos grupos controle. Em relação aos animais do grupo diabéticos, notava-se maior preservação dos tecidos periodontais nos animais diabéticos irradiados do que os não irradiados.

Na literatura encontra-se diferentes protocolos de aplicação do laser de baixa potência nos estudos *in vivo* com relação ao comprimento de onda utilizado (Lopes et al., 2005; da Silva et al., 2006; Miloro et al., 2007), dosimetria (Freitas et al., 2000; Marino et al., 2003),

tipo de lesão produzida (Khadra et al., 2005; Carvalho et al., 2002) e osso estudado (Shibli et al., 2006; Lopes et al., 2007), o que dificulta uma comparação entre eles.

Verificou-se neste estudo que o valor de densidade de 20 J/cm² foi adequada e eficaz na biorregulação ou normalização das funções celulares, contribuindo positivamente na regeneração dos tecidos periodontais, durante a aplicação de força ortodôntica o que corrobora com os resultados de Hiraoka et al., (2011). Aventamos, ainda, a hipótese de que a ação da força ortodôntica, associada à irradiação laser, no periodonto de sustentação estimulou a atividade mitocondrial e, conseqüentemente, com aumento da produção de ATP, houve repercussão no aumento da atividade osteoblástica e fibroblástica, além de se tornarem mecanismos compensatórios em relação aos efeitos da doença metabólica e do possível estresse dos animais diabéticos irradiados,

Segundo Holtgrave e Donath (1989), durante a movimentação ortodôntica, o tecido neoformado em diabéticos não tem as mesmas características estruturais e metabólicas quando comparado com o tecido ósseo normal. Este fato foi parcialmente evidenciado em nossas pesquisas, uma vez que a quantidade de perda de tecido ósseo alveolar, as alterações das fibras periodontais e reabsorções radiculares foram maiores nos grupos diabéticos não irradiados do que nos grupos normoglicêmicos (Controle e Laser) e Diabetes-Laser, em todos os períodos de observações estudados.

Portanto, sugerimos a aplicação da laserterapia em indivíduos diabéticos, como coadjuvante no tratamento ortodôntico. É importante salientar que a indicação deste tratamento deve ser muito bem estudada, uma vez que depende exclusivamente das condições gerais e bucais do indivíduo portador do Diabetes, diante do exposto, é de suma importância que os odontólogos conheçam as alterações sistêmica e bucal do DM e os efeitos bioestimuladores da laserterapia nos tecidos

periodontais durante aplicação de forças ortodônticas, com o intuito de indicar um tratamento ortodôntico de excelência para os pacientes portadores do DM.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e dentro das condições experimentais desta pesquisa, pode-se concluir que houve efetividade da radiação laser AsGaAl nos tecidos periodontais durante a movimentação ortodôntica, estimulando a dinâmica do processo de remodelação óssea alveolar, visto que, a fisiopatologia da doença diabetes não interferiu na integridade da microarquitetura dos tecidos periodontais.

REFERÊNCIAS[™]

Abbassy MA, Watari I, Soma K. The effect of diabetes mellitus on rat mandibular bone formation and microarchitecture. *Eur J Oral Sci.* 2010;118(4):364-9.

Adeyemo WL, Reuther T, Bloch W, Korkmaz Y, Fischer JH. Healing of onlay mandibular bone grafts covered with collagen membrane or bovine bone substitutes: a microscopical and immunohistochemical study in the sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008;37(7):651-9.

Almeida JM, Theodoro HL, Bosco AF, Nagata MJH, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol.* 2008;79(11):2156-65.

Al-Watban FA, Zhang XY. Comparision of wound healing process using argon and krypton lasers. *J Clin Laser Med Surg.* 1997;15(1):209-215.

Alves C, Andion J, Brandão M, Menezes R. Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao diabetes melito. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007;51(7):1050-7.

Alves C, Brandão M, Andion J, Menezes R, Carvalho F. Atendimento odontológico do paciente com diabetes melito: recomendações para a prática clínica. *R Ci Med Biol.* 2006;5(2):97-110.

American Diabetes Association. Position Statement. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2009;32(1):62-S67.

[™] Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM: c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Amorim FP, Ornelas SS, Diniz SF, Batista AC, Silva TA. Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetic rats. *J Mol Histol.* 2008;39(4):401-8.

Anandarajah AP, Schwarz EM. Anti-RANKL therapy for inflammatory bone disorders: mechanisms and potential clinical applications. *J Cell Biochem.* 2006;97(2):226-32.

Andersen CC, Flyvbjerg A, Buschard K, Holmstrup P. Relationship between periodontitis and diabetes: lessons from rodent studies. *J Periodontol.* 2007;78(7):1264-75.

Andrade FR, Sousa DP, Mendonça EF, Silva TA, Lara VS, Batista AC. Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(4):548-55.

Ashizawa Y, Sahara N. Quantitative evaluation of newly formed bone in the alveolar wall surrounding the root during the initial stage of experimental tooth movement in the rat. *Arch Oral Biol.* 1998;43(6):473-84.

Beeton CA, Bord S, Ireland D, Compston JE. Osteoclast formation and bone resorption are inhibited by megakaryocytes. *Bone.* 2006;39(5):985-90.

Bensch L, Braem M, Willems G. Orthodontic considerations in the diabetic patient. *Semin Orthod.* 2004;10(4):252-8.

Bildt MM, Henneman S, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. CMT-3 inhibits orthodontic tooth displacement in the rat. *Arch Oral Biol.* 2007;52(6):571-8.

Bjordan JM, Couppé C, Chow RT, Tunér J, Ljunggren EA. A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. *Aust J Physiother.* 2003;49(2):107-16.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.

Braga MD, Machado R, Ribeiro LC, Stoye J. Genomic distance under gene substitutions. *BMC Bioinformatics*. 2011;12(9):S8.

Brekke JH, Toth JM. Principles of tissue engineering applied to programmable osteogenesis. *J Biomed Mater Res*. 1998;43(4):380-98.

Brugnera Jr A, Pinheiro ALB. Lasers na odontologia moderna. São Paulo: Pancast; 1998.

Carboni AMG, Carvalho LAC, Mello WR, Magalhães MHCG. Anomalias sistêmicas e bucais em pacientes com diabetes mellitus: revisão e relato de caso clínico. *Diabetes Clínica*. 2000;4(1):62-8.

Carda C, Silvestrini G, Gomez de Ferraris ME, Peydró A, Bonucci E. Osteoprotegerin (OPG) and RANKL expression and distribution in developing human craniomandibular joint. *Tissue Cell*. 2005;37(3):247-55.

Carvalho DCL, Rosim GC, Gama LOR, Tavares MR, Tribioli RA, Santos IR, et al. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. *Rev Saúde Pública*. 2002; 36(5):647-54.

Chappard D, Legrand E, Massin P, Basle MF, Audran M. Pathophysiologie des métastases osseuses. *Prog Urologie*. 2003; 13(1):9-17.

Consolaro A. Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. Maringá. Dental Press. 2012; 153-78.

Costardi CHZ, Tamachiro C, Junior IE, Gomes AC. Efeito do laser de baixa intensidade (670 nm) após contusão muscular em ratos. *Fisioter Mov*. 2008;21(2):21-30.

Cruz DR, Kohara EK, Ribeiro MS, Wetter NU. Effects of Low-intensity laser therapy on the orthodontic movement velocity of human teeth: a preliminary study. *Lasers Surg Med.* 2004;35(2):117-20.

da Silva RV, Camili JA. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser. *J Craniofac Surg.* 2006;17(2):297-301.

da Silva TA, Batista AC, Mendonça EF, Leles CR, Fukada S, Cunha FQ. Comparative expression of RANK, RANKL, and OPG in keratocystic odontogenic tumors, ameloblastomas, and dentigerous cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105(3):333-41.

Dall Agnol MA, Nicolau RA, de Lima CJ, Munin E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24(6):909-16.

Damante CA, Gregghi SL, Santana AC, Passanezi E. Clinical evaluation of the effects of low-intensity laser (GaAlAs) on wound healing after gingivoplasty in humans. *J Appl Oral Sci.* 2004;12(2):133-6.

Duarte PM, Neto JB, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Diabetes modulates gene expression in the gingival tissues of patients with chronic periodontitis. *Oral Dis.* 2007;13(6):594-9.

Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* 2000;289(5484):1501-4.

Dummett CO. Clinical observations on pigment variations in healthy oral tissues of the negro. *J Dent Res.* 1945;24(1):7-13.

Feng X. Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts. *Gene.* 2005 Apr;350(1):1-13..

Ferreira ANS. Ação do laser terapêutico de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) na indução da dentinogênese reacional em dentes humanos. Dissertação de mestrado apresentado no programa de Pós-Graduação em Bioengenharia. 2002.

Fiorellini JP, Nevins ML, Norkin A, Webwe HP, Karimbux NY. The effect of insulin therapy on osseointegration in a diabetic rat model. *Clin Oral Implants Res.* 1999;10(5):362-8.

Foo M, Jones A, Darendeliler MA. Physical properties of root cementum: Part 9. Effect of systemic fluoride intake on root resorption in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131(1):34-43.

Freitas IGF, Baranauskas V, Cruz-Hofling MA. Laser Effects on Osteogenesis. *App Surf Sci.* 2000;154(1):548-54.

Fujita S, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Low-energy laser stimulates tooth movement velocity via expression of RANK and RANKL. *Orthod Craniofac Res.* 2008;11(3):143–55.

Galili D, Findler M, Garfunkel AA. Oral and dental complications associated with diabetes and their treatment. *Compend Contin Educ Dent.* 1994;15(4):496-501.

Gallagher JC. Advances in bone biology and new treatments for bone loss. *Maturitas.* 2008;60(1):65-9.

Galluzzi F, Stagi S, Salti R, Toni S, Piscitelli E, Simonini G, et al. Osteoprotegerin serum levels in children with type 1 diabetes: a potential modulating role in bone status. *Eur J Endocrinol.* 2005;153(6):879-85.

Gavish U, Yurke B, Imry Y. Generalized constraints on quantum amplification. *Phys Rev Lett.* 2004;93(25):4.

Gibson JM, King GJ, Keeling SD. Long-term orthodontic tooth movement response to short-term force in the rat. *Angle Orthod.* 1992;62(3):211-5.

Gokce S, Bengi AO, Akin E, Karacay S, Sagdic D, Kurkcu M. Effects of hyperbaric oxygen during experimental tooth movement. *Angle Orthod.* 2008;78(2):304-8.

Golmia R, Scheinberg M. Atualização em osteoprotegerina. Einstein. 2004;2(3):220-1.

Gomes MF, Banzi EC, Destro MF, Lavinicki V, Goulart MG. Homogenous demineralized dentin matrix for application in cranioplasty of rabbits with alloxan-induced: diabetes histomorphometric analysis. Int J Oral Maxillofac Implants. 2007;22(6):939-47.

Gotz W, Kunert D, Zhang D, Kawarizadeh A, Lossdorfer S, Jager A. Insulin-like growth factor system components in the periodontium during tooth root resorption and early repair process in the rat. Eur J Oral Sci. 2006;114(4):318-27.

Goulart CS, Nouer PR, Mouramartins L, Garbin IU, de Fátima Zanirato, Lizarelli R. Photoradiation and orthodontic movement: experimental study with canines. Photomed Laser Surg. 2006;24(2):192-6.

Gregg EW, Mangione CM, Cauley JA, Thompson TJ, Schwartz AV, Ensud KE, et al. Diabetes and incidence of functional disability in older women. Diabetes Care. 2002;25(1):61-7.

Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. J Am Osteopath Assoc. 2000;100(10):621-34.

Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica. 9. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1997.

Hamaya M, Mizaguchi I, Sakakura Y, Yajima T, Abiko Y. Cell death of osteocytes occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. Calcif Tissue Int. 2002;70(2):117-26.

Harris EF. Root resorption during orthodontic therapy. Semin Orthod. 2000;6(3):183-94.

Haynes DR. Bone Lysis and inflammation. Inflamm Res. 2004;53(11):596-600.

He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology*. 2004;145(1):447-52.

Heap J, Murray MA, Miller SC, Jalili T, Moyer-Mileur LJ. Alterations in bone characteristics associated with glycemic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr*. 2004;144(1):56-62.

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

Hie M, Shimono M, Fujii K, Tsukamoto I. Increased cathepsin K and tartrate-resistant acid phosphatase expression in bone of streptozotocin induced diabetic rats. *Bone*. 2007;41(6):1045-50.

Hildebrand HC, Epstein J, Larjava H. The influence of psychological stress on periodontal disease. *J West Soc Periodontol Abstr*. 2000;48(3):69-77.

Hiraoka CM. Estudo comparativo das diferentes densidades de energia do laser Arseneto de Gálio e Alumínio (780 nm) aplicado no periodonto de ratos diabéticos, após movimentação ortodôntica: análises radiográfica e histológica [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011.

Hofbauer LC, Heufelder AE. Clinical review 114. Hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(7):2355-63.

Holthgrave EA, Donath K. Periodontal reactions to orthodontic forces in diabetic metabolic state. *Fortschr Kieferorthop*. 1989;50(4):326-37.

Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001;12(1):9-18.

Hove KA, Stallard RE. Diabetes and the periodontal patient. J Periodontol. 1970;41(12):713-8.

Hsu Y, Niu T, Terwedow HA, Xu X, Feng Y, Li Z, et al. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men. Hum Genet. 2006;118(5):568-77.

Jakus V, Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. Physiol Res. 2004;53(2):131-42.

Jilka RL. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. Med Pediatr Oncol. 2003;41(3):182-5.

Jorgensen L, Vik A, Emaus N, Brox J, Hansen JB, Mathiesen E, et al. Bone loss in relation to serum levels of osteoprotegerin and nuclear factor kappaB ligand: the troms study. Osteoporos Int. 2010;21(6):931-8.

Junqueira LCU, Carneiro JSF. Histologia Básica. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Karsenty G. Bone formation and factors affecting this process. Matrix Biol. 2000;19(2):85-9.

Karu, T. Photobiology of low power laser effects. Health Phys. 1989;56(5):691-704.

Karu, T. The science of low-power laser therapy. Amsterdam: Gordon and Breach Sci Publ; 1998.

Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. Oral Dis. 2002;8(3):147-59.

Katchburian E, Arana V. Histologia e Embriologia Oral. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihiro S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol.* 2006;169(3):987-98.

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

Kayal RA, Tsatsas D, Bauer MA, Allen B, Al-Sebaei MO, Kakar S, et al. Diminished bone formation during diabetic fracture healing is related to the premature resorption of cartilage associated with increased osteoclast activity. *J Bone Miner Res.* 2007;22(4):560-8.

Khadra M. The effect of low level laser irradiation on implant-tissue interaction. In vivo and in vitro studies. *Swed Dent J Suppl.* 2005;1(3):172-4.

Kim YD, Kim SS, Kim TG, Kim GC, Park SB, Son WS. Effect of low level laser treatment during tooth movement-immunohistochemical study of RANKL, RANK, OPG: an experimental study in rats. *Laser Phys.* 2007;4(8):616-23.

Kim YD, Song WW, Kim SS, Kim GC, Hwang DS, Shin SH, et al. Expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand, receptor activator of nuclear factor-kappaB, and osteoprotegerin, following low-level laser treatment on deproteinized bovine bone graft in rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24(4):577-84.

Knudsen ST, Foss CH, Poulsen PL, Andersen NH, Mogensen CE, Rasmussen LM. Increased plasma concentrations of osteoprotegerin in type 2 diabetic patients with microvascular complications. *Eur J Endocrinol.* 2003;149(1):39-42.

Kobayashi Y, Udagawa N, Takahashi N. Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009;19(1):61-72.

Kogianni G, Noble BS. The biology of osteocytes. *Curr Osteoporos Rep.* 2007;5(2):81-86.

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*. 2003;82(3):177-82.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(2):165-76.

Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W, et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest*. 2000;105(8):1117–124.

Lemaire V, Tobin FL, Greller LD, Cho CR, Suva LJ. Modeling the interactions between osteoblast and osteoclast activities in bone remodeling. *J Theor Biol*. 2004;229(3):293–309.

Leme JACA, Castellar A, Remedio RN, Barbosa RA, Moura LP, Dalia RA, et al. Efeitos em curto prazo da aplicação de aloxana para Indução de diabetes em ratos wistar. *Biosci J Uberlândia*. 2010;26(3):451-6.

Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans*. 2008;36(3):343-7.

Lerco MM, Spadella CT, Machado JLM, Schellini AS, Padovani CR. Caracterização de um modelo experimental de diabetes mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. *Acta Cir Bras*. 2003;18(2):132-42.

Li X, Zhang L, Wang N, Feng X, Bi L. Periodontal ligament remodeling and alveolar bone resorption during orthodontic tooth movement in rats with diabetes. *Diabetes Technol Ther*. 2010;12(1):65-73.

Liu JM, Zhao HY, Ning G, Zhao YJ, Chen Y, Zhang Zh, et al. Relationships between the changes of serum levels of OPG and RANKL with age, menopause, bone biochemical markers and bone mineral density in Chinese women aged 20-75. *Calcif Tissue Int*. 2005;76(1):1-6.

Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Interactive effect of interleukin-6 and prostaglandin E2 on osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK system. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;(1068):225-33.

Lopes CB, Pinheiro AL, Sathaiah S, da Silva NS, Salgado MA. Infrared laser photobiomodulation (830 nm) on bone tissue around dental implants: a Raman Spectroscopy and scanning electronic microscopy study in rabbits. *Photomed Laser Surg.* 2007;25(2):96-101.

Lopes CB, Pinheiro AL, Sathaiah S, Duarte J, Cristinamartins M. Infrared laser light reduces loading time of dental implants: a Raman spectroscopy study. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(1):27-31.

Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 2003;144(1):346-52.

Lu H, Raptis M, Black E, Stan M, Amar S, Graves DT. Influence of diabetes on the exacerbation of an inflammatory response in cardiovascular tissue. *Endocrinology.* 2004;145(1):4934-9.

Luc Bensch, Braem M, Van Acker K, Willems G. Orthodontic treatment considerations in patients with diabetes mellitus. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003;123(1):74-8.

Madeiro AT, Bandeira FG, Figueiredo CRLV. A estreita relação entre diabetes e doença periodontal inflamatória. *Odontol Clín Científ.* 2005;4(1):07-11.

Maraschin JF, Murussi N, Witter V, Silveiro SP. Classificação do diabetes melito. *Arq Bras Cardiol.* 2010;95(2):40-7.

Margonar R, Sakakura CE, Holzhausen M, Pepato MT, Alba RC, Marcantonio E. The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: a study in rabbits. *Implant Dent.* 2003;12(4):333-9.

Marino JAM, Taciro C, Zuanon JAS, Benatti Neto C, Parizotto NA. Efeito do Laser terapêutico de baixa potência sobre o processo de reparação óssea em tibia de rato. *Rev Bras Fisioter.* 2003;7(2):167-73.

McCormick RK. Osteoporosis: integrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility. *Altern Med Rev.* 2007;12(2):113-45.

Melgaço CA. Diabetes melito e a doença periodontal: revisão da literatura. *JBE.* 2002;3(9):100-4.

Melsen B. Tissue reaction to orthodontic tooth movement: a new paradigm. *Eur J Orthod.* 2001;23(6):671-81.

Menezes R, Bramant CM, da Silva Paiva KB, Letra A, Carneiro E, Fernando Zambuzzi W, et al. Receptor activador NF-KappaB-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(3):404-9.

Mermut S, Bengi AO, Akin E, Kiirkçu M, Karaçay S. Effects of interferon-gamma on bone remodeling during experimental tooth movement. *Angle Orthod.* 2007;77(1):135-41.

Miller JR, Davila JE, Hodges JS. Effect of surgical denervation on orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131(5):620-26.

Miloro M, Miller JJ, Stoner JA. Low-level laser effect on mandibular distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(2):168-76.

Misawa-Kageyama Y, Kageyama T, Moriyama K, Kurihara S, Yagasaki H, Deguchi T. Histomorphometric study on the effects of age on orthodontic tooth movement and alveolar bone turnover in rats. *Eur J Oral Sci.* 2007;115(2):124-30.

Miserendino LJ, Pick RM. Lasers in Dentistry. Chicago: Quintessence Publishing; 1995. 341p.

Moraes FF, Chaves VEA, Fava M, Fundamentos histológicos aplicados à ortodontia. Interlandi S. Ortodontia bases para iniciação. 5. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2002. p89-100.

Moschen AR, Kaser A, Stadlmann S, Millonig G, Kaser S, Muhllechner P, et al. The RANKL/OPG system and bone mineral density in patients with chronic liver disease. J Hepatol. 2005;43(6):973-83.

Nagasawa T, Noda M, Katagiri S, Takaichi M, Takahashi Y, Wara-Aswapati N, et al. Relationship between periodontitis, and diabetes-importance of a clinical study to prove the vicious cycle. Intern Med. 2010;49(10):881-5.

Nakajima K, Hamada N, Takahashi Y, Sasaguri K, Tsukinoki K, Umemoto T, et al. Restraint stress enhances alveolar bone loss in an experimental rat model. J Periodontal Res. 2006;41(6):527-37.

Nakamichi Y, Udagawa N, Kobayashi Y, Nakamura M, Yamamoto Y, Yamashita T, et al. Osteoprotegerin reduces the serum level of receptor activator of NF-KappaB ligand derived from osteoblasts. J Immunol. 2007;178(1):192-200.

Nícoli GA, Lope LA, Souza PPC, Souza LB. Avaliação *in vitro* do metabolismo de células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 submetidas à aplicação do laser de baixa potência. Rev Odontol UNESP. 2006;35(2):151-6.

Noxon SJ, King GJ, Gu G, Huang G. Osteoclast clearance from periodontal tissues during orthodontic tooth movement. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2001;120(5):466-76.

Ozawa Y, Shimzu N, Kariya G, Abiko Y. Low energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. Bone. 1998;22(4):347-54.

Peruzzo DC, Benatti BB, Antunes IB, Andersen ML, Sallum EA, Casati MZ, et al. Chronic stress may modulate periodontal disease: a study in rats. *J Periodontol*. 2008;79(4):697-704.

Proffit WR. As bases biológicas da terapia ortodôntica. In: Proffit WR, Fields Júnior HW. *Ortodontia contemporânea*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p 280-306.

Pulsatelli L, Dolzani P, Silvestri T, Caraceni P, Facchini A, Ravaglia G, et al. Soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (sRANKL)/osteoprotegerin balance in ageing and age-associated diseases. *Biogerontology*. 2004;5(2):119-27.

Ramalho LT, Bozzo L. Biomecânica do movimento ortodôntico: resposta inicial dos tecidos periodontais. *Rev Odonto UNESP*. 1990;19(1):1-11.

Reinehr T, Schober E, Wiegand S, Thon A, Holl R, DPV-Wiss Study Group. Beta-cell autoantibodies in children with type 2 diabetes mellitus: subgroup or misclassification? *Arch Dis Child*. 2006;91(6): 473-7.

Reitan K. Biomechanical principles and reactions. In Grabber TM, Swain BF. *Orthodontics: currents principles and technique*, St Louis: The CV Mosby. 1985;(3):101-192.

Ren Y, Kuijpers-jagtman AM, Maltha JC. Immunohistochemical evaluation of osteoclast recruitment during experimental tooth movement in young and adults rats. *Arch Oral Biol*. 2005;50(12):1032-9.

Renvert S. Destructive periodontal disease in relation to diabetes mellitus, cardiovascular diseases, osteoporosis and respiratory diseases. *Oral Health Prev Dent*. 2003;1(1):341-57.

Robbins, Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Patologia estrutural e funcional*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Rodrigues MTJ. Efeito Terapêutico da irradiação com laser de GaAlAs (830nm) em lesões provocadas pelo aparelho ortodôntico fixo na

cavidade oral. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia de São Paulo: USP – Universidade de São Paulo; 2001.

Rodrigues R, Pozzobon A, Hoerlle J, Rempel C, Périco A. Avaliação do perfil glicêmico de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 com e sem administração de infusão de folhas de *averrhoa carambola*. Scientia Medica. 2010;20(2):161-5.

Rogers A, Eastell R. Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear fator kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90(11):6323-31.

Sá HP, Nunes H, Santo AEL, Oliveira Júnior GC, Silva JMN, Alves KS. Comparative study of laser action GaAlInP and high-frequency generator in the treatment of skin wounds in rats: an experimental study. Conscientiae saúde. 2010;9(3):360-66.

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. 1997;111(5):525–32.

Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. Science. 2007;317(5838):627-9.

Santamaria MJr, Milagres D, Lyomosa MM, Stuani MB, Ruellas AC. Initial pulp changes during orthodontic movement: histomorphological evaluation. Braz Dent J. 2007;18(1):34-9.

Seck T, Diel I, Bismar H, Ziegler R, Pfeilschifter J. Serum parathyroid hormone, but not menopausal status, is associated with the expression of osteoprotegerin and RANKL mRNA in human bone samples. Eur J Endocrinol. 2001;145(2):199-205.

Shankaracharya M, Odedra D, Mallick M, Shukla P, Samanta S, Vidyarthi AS. Java-based diabetes type 2 prediction tool for better diagnosis. Diabetes Technol Ther. 2012;14(3):251-6.

Shibli, JA, Martins MC, Ribeiro FS, Garcia VG, Nociti FHJr, Marcantonio EJr. Lethal photosensitization and guided bone regeneration in treatment of peri-implantitis: an experimental study in dogs. Clin Oral Implants Res. 2006;17(3):273-81.

Ship JA. Diabetes and oral health. An overview. J Am Dent Assoc. 2003;134(1):4-10.

Shirazi M, Nilforoushan D, Alghasi H, Dehpour AR. The role of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. Angle Orthod. 2002;72(3):211-5.

Silveira D, Franco F, Nascimento I, Salomão M, Araújo T. Alterações periodontais durante a movimentação dentária induzida em ratos. Revi Odonto Ciência. 2006;21(54):332-7.

Smith R. Bone physiology and the osteoporotic process. Respir Med. 1993;87(A):3-7.

Soares AC, Leite R, Tatsuo MA, Duarte ID. Activation of ATP-sensitive K (+) channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprosside. Eur J Pharmacol. 2000;400(1):67-71.

Sonis ST, Fazio RC, Fang L. Medicina Oral. 4. Ed. Rio de Janeiro: Interamericana; 1985.

Stains JP, Civitelli R. Cell-to-cell interactions in bone. Biochemical and biophysical research communications. 2005;328(3):721-7.

Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts *in vitro*. Photomed Laser Surg. 2005;23(2):161–6.

Stolina M, Adamu S, Ominsky M, Dwyer D, Asuncion F, Geng Z, et al. RANKL is a marker and mediator of local and systemic bone loss in two rat models of inflammatory arthritis. J Bone Miner Res. 2005;20(10):1756-65.

Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone*. 1995;17(2):87S-91S.

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50(6):537-46.

Takada M, Hirata K, Ajiki T, Susuki Y, Kuroda Y. Expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE) and MMP-9 in human pancreatic cancer cells. *Hepatogastroenterology*. 2004;51(58):928-30.

Takahashi N, Ejiri S, Yanagisawa S, Ozawa H. Regulation of osteoclast polarization. *Odontology*. 2007;95(1):1-9.

Tang T, Lin Z, Li YM. Effects of different magnitudes of mechanical strain on osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;344(1):122-8.

Taweechaisupapong S, Srisuk N, Nimitpornsuko C, Vattraphoudes T, Rattanayatikul C, Godfrey K. Evening primrose oil effects on osteoclasts during tooth movement. *Angle Orthod*. 2005;75(3):356-61.

Théoleyre S, Kwan Tat S, Vusio P, Blanchard F, Gallagher J, Ricard-Blum S, et al. Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: role in the interactions with receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) and RANK. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;347(2):460-7.

Thraillkill KM, Liu L., Wahl EC, Bunn RC, Perrien DS, Cockrell GE, et al. Bone formation is impaired in a model of Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2005;54(10):2875-81.

Tominaga M. Histopathological study on experimental tooth movement in the spontaneously diabetic rat. *J Fukuoka Dent College*. 2007;22(2):247-68.

Tuner J, Hode L. The new laser therapy handbook. Grangesberg: Prima Books; 2007.

Verhaeghe J, Bouillon R. Effects of diabetes and insulin on bone metabolism: principles of bone biology. 1996;32(2):549-61.

Verna C., Dalstra M, Melsen B. Bone turnover rate in rats does not influence root resorption induced by orthodontic treatment. Eur J Orthod. 2003;25(4):359-63.

Vernillo AT. Dental considerations for the treatment of patients with diabetes mellitus. J Am Dent Assoc. 2003;134(1):245-335.

Vieira V, Guerreiro D, Silva P. Pessoas com diabetes mellitus: suas escolhas de cuidados e tratamentos. Rev. Bras. Enferm. 2006;59(3):297-302.

Vignery A, Baron R. Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat. Anat Rec. 1980;196(2):191-200.

Vila Real LAS, Ramos AL, Zanoni JN. Modificações no periodonto de ratos diabéticos após a movimentação ortodôntica. R Dental Press Ortodon Ortop Facial. 2009;14(1):124-31.

Wagle N, Do NN, Yu J, Bork JL. Fractal analysis of the PDL-bone interface and implications for orthodontic tooth movement. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2005;127(6):655-61.

Walsh LJ. The current status of laser applications in dentistry. Aust Dent J. 2003;48(3):146-55.

Whitson SW. Bone. In: Ten Cate A.R. Oral Histology: development, structure and function. 4. ed. St. Louis: Mosby; 1994. p120-46.

Yamaguchi M. RANK/RANK-L/OPG during orthodontic tooth movement. Orthod Craniofac Res. 2009;12(2):113-9.

Yamazaki H, Sasaki T. Effects of osteoprotegerin administration on osteoclast differentiation and trabecular bone structure in osteoprotegerin deficient mice. *J Electron Microsc.* 2005;54(5):467-77.

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

Zezell DM, Simões M, Gutknecht N, Eduardo CPA. Laser em baixa intensidade. *Odontologia e o Laser.* 2004;(5):217-236.

Zhang X, Peng B, Fan M, Bian Z, Chen Z. The effect of estrogen deficiency on receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin synthesis in periapical lesions induced in rats. *J Endod.* 2007;33(9):1053-6.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028
Fax (12) 3947-9010 / yasmin@fosjc.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **11/2011-PA/CEP**, sobre **“Efeitos da radiação laser de As-Ga-A (780 nm) no periodonto de ratos diabéticos durante movimentação ortodontônica: Análise radiográfica, histológica e imunohistoquímica, sob a responsabilidade de MONICA FERNANDES GOMES**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA e Lei Arouca nº 11.794 de 08/10/2008 e foi aprovado por este Comitê de Ética.

São José dos Campos, 10 de agosto de 2011.

Prof.Assist.Dr. RUBENS NISIE TANGO
Coordenador