

ARETHA GRAZIELA VILELA DE SOUSA

**EFEITOS DA RADIAÇÃO LASER ARSENETO DE GÁLIO E
ALUMÍNIO ($\lambda=780\text{nm}$) NO PERIODONTO DE
SUSTENTAÇÃO DE RATOS DIABÉTICOS DURANTE A
MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA: análises radiográfica e
histológica**



ARETHA GRAZIELA VILELA DE SOUSA

**EFEITOS DA RADIAÇÃO LASER ARSENETO DE GÁLIO E
ALUMÍNIO ($\lambda=780\text{nm}$) NO PERIODONTO DE
SUSTENTAÇÃO DE RATOS DIABÉTICOS DURANTE A
MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA: análises radiográfica e
histológica**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Fernandes Gomes

São José dos Campos

2011

Banca examinadora

Profa. Dra. Mônica Fernandes Gomes (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Univ Estadual Paulista

Profa. Dra. Maria das Graças Vilela Goulart

Pesquisadora do Centro de Biociências Aplicado à Pacientes com

Necessidades Especiais (CEBAPE)

UNESP – Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 25 de outubro de 2011

Dedicatória

À **Deus** pois sem a sua presença nada poderia ter feito.
Meu conselheiro nos momentos de dúvida, consolador nos momentos de angustia e ajudador nos momentos em que encontrei-me em dificuldades. Inútil será bem cedo levantar e penosamente trabalhar, pois aos seus amados, o Senhor dá enquanto dormem.

Aos meus **pais** que são meu porto seguro, suporte e incentivo, sendo eu eterna devedora a eles. Pela presença constante em minha vida, apontando sempre a melhor direção, cuidando sempre com muito zelo de minha filha.

Às minhas **irmãs, Simone, Aline e Jéssica** por serem minhas companheiras e melhores amigas. Sempre prontas para me ajudar e para tal não medindo esforços.

Ao meu marido **Jairo** por toda sua paciência e compreensão, durante este longo período. Pelo seu amor e compaixão, sendo em tudo um grande companheiro.

À **Sophia Lara**, pessoa que mais amo no mundo inteiro, a qual teve seu tempo dividido com esta pesquisa. Filha, você sim é razão de minha alegria, meu esforço e minha dedicação.

Agradecimentos

À Prof. Dra. Mônica Fernandes Gomes, da disciplina de Patologia Bucal de Faculdade de Odontologia da Unesp de São José dos Campos, minha orientadora, por ter me acolhido no mundo científico, dispensando mim seu voto de confiança e dividindo comigo seu amplo conhecimento. Muito obrigada.

À Prof. Dra. Maria das Graças Vilela Goulart, pesquisadora do CEBAPE/ Unesp, pela ajuda, durante o desenvolver desta pesquisa, nos momentos de maiores dificuldades.

Ao Prof. Dr. Miguel Angel Castillo Salgado, da disciplina de Histologia da Faculdade de Odontologia da Unesp de São José dos Campos pela disposição e auxílio constantes, por sempre compartilhar sua vasta experiência e ensinamentos na área de histologia.

Aos professores do programa de Pós Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, por dividirem um pouco do seu conhecimento.

À Professora Cristiane Yumi Koga Ito, pelo exemplo e retidão de caráter, conduta ética e de liderança, por ser exemplo tanto profissional quanto de pessoal, meu muito obrigada por todo seu apoio como Coordenadora da Pós Graduação desta Instituição.

À todos da secretaria de pós graduação, meu reconhecimento pelo desenvolvimento de seu trabalho e preocupação em todas as atividades, a ajuda de vocês foi essencial.

À todos do CEBAPE (Centro de Biociências Aplicada a Pacientes Especiais) pela amizade e pelo apoio em todos os momentos por termos compartilhado juntos as dificuldades e alegrias durante esses anos. Em especial ao Walter da Cruz pela ajuda no momento em que mais necessitei.

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 ajuda com os animais na fase experimental deste trabalho.

Às amigas Cybelle Mori Hiraoka, Gabriela de Fátima Santana Melo, Valeria Adriano meu agradecimento a paciência a mim dispensada em todos os momentos, que certamente foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

À amiga Valeria Adriano meu agradecimento por toda sua grande ajuda. Sua dedicação a mim dispensada em todos os momentos, que certamente foi imprescindível para a conclusão deste trabalho.

À todos os meus amigos de todas as horas cujos nomes não estão citados, meu muito obrigada por tudo, tenham a certeza de que estão nos meus pensamentos todos os dias.

À VOCÊS, MEU MUITO OBRIGADO!

*" Como é feliz aquele que não segue os conselhos dos ímpios,
Não imita a conduta dos pecadores,
Nem se assenta na roda dos zombadores!
Ao contrário, sua satisfação esta na lei do SENHOR,
E nessa lei medita de dia e de noite.
É como árvore plantada à beira de águas correntes:
Dá fruto no tempo certo e suas folhas não murcham.
Tudo o que ele faz prospera!
Não é o caso dos ímpios!
São como palha que o vento leva.
Por isso os ímpios não resistiram ao julgamento,
nem aos pecadores na comunidade dos justos.
Pois o SENHOR aprova o caminho dos justos,
mas o caminho dos ímpios leva a destruição"*

Salmo 1

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURA.....	10
LISTA DE TABELA.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	15
REUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
1INTRODUÇÃO.....	20
2REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1Diabetes mellitus (DM).....	23
2.1.1Doença periodontal no DM.....	26
2.2 Ortodontia.....	29
2.2.1 Fatores sistêmicos associados à movimentação ortodôntica.....	31
2.3 Laser de Baixa Potência (LBP).....	35
2.3.1LBP e DM.....	39
2.3.2 LBP e Movimentação Ortodôntica (MO)	43
2.4 Marcador imunohistoquímico	46
2.4.1Osteopontina.....	46
3 PROPOSIÇÃO.....	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
5 RESULTADOS.....	63
6 DISCUSSÃO.....	99
7 CONCLUSÃO.....	105
8REFERÊNCIAS.....	106
ANEXO.....	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Técnica da administração do aloxano monoidratado na veia peniana (a e b).....	54
Figura 2- Monitoramento da glicemia do animal.....	55
Figura 3- Posicionamento de abridores de boca confeccionados com fio e aço inoxidável de 0,8 de diâmetro (a) e instalação de mola de Niti no 1º molar inferior e incisivo inferior do lado direito (b), exercendo uma força de 20 cN.....	56
Figura 4 – Ilustração exibindo o procedimento de mensuração das medidas lineares das distâncias entre a junção amelo-cementária da face distal do 1º molar inferior e a junção amelo-cementária da face mesial do 2º molar inferior, utilizando a ferramenta “régua” do programa Photoshop 3.0.....	58
Figura 5- Representação gráfica dos valores médios da medida linear entre a junção amelo-cementária da face distal do 1º molar inferior e a junção amelo-cementária da face mesial do 2º molar inferior, do lado direito, após movimentação ortodôntica, em todos os grupos estudados.....	65
Figura 6 – Controle 7 dias. Fotomicrografia mostrando região do 1º molar inferior movimentado (a) exibindo papila interproximal entre os 1º e 2º molares inferiores (b) e furca do 1º molar inferior com aspecto normal. Aumento original: 100x; H.E..	67
Figura 7 – Laser 7 dias. Fotomicrografia mostrando região do 1º molar inferior movimentado (a) exibindo papila interproximal entre os 1º e 2º molares inferiores (b) e furca do 1º molar inferior com aspecto normal. Aumento original: 100x; H.E.....	69

Figura 8 – **Diabetes 7 dias**. Fotomicrografia mostrando região do 1º molar inferior movimentado (a) exibindo papila interproximal entre os 1º e 2º molares inferiores (b) e furca do 1º molar inferior com aspecto normal. Aumento original: 100x; H.E... 71

Figura 9 – **Diabetes-Laser 7 dias**. Fotomicrografia mostrando região do 1º molar inferior movimentado (a) exibindo papila interproximal entre os 1º e 2º molares inferiores (b) e furca do 1º molar inferior com aspecto normal. Aumento original: 100x; H.E.. 73

Figura 10 – **Diabetes-Laser 7 dias**. Diferentes aspectos histológicos das regiões interproximal, entre os 1º e 2º molares inferiores (a e a') e de furca (b e b') em alguns ratos diabéticos tratados com radiação laser. Aumento original: 100x; H.E..... 74

Figura 11 – **Controle 14 dias**. Fotomicrografia da região do 1º molar inferior (a) exibindo severa periodontite crônica na região interproximal (b) e intenso infiltrado de células inflamatórias mononucleares na região de furca do dente envolvido na movimentação ortodôntica (c). Aumento original: 100x; H.E..... 76

Figura 12 – **Laser 14 dias**. Fotomicrografia exibindo região do 1º molar inferior (a) mostrando papila interproximal entre os 1º e 2º molares inferiores (b) e furca do 1º molar inferior com aspecto normal. Aumento original: 100x; H.E..... 78

Figura 13 – **Diabetes 14 dias**. Fotomicrografia exibindo região do 1º molar inferior (a) mostrando papila interproximal entre os 1º e 2º molares inferiores (b) e furca do 1º molar inferior com aspecto normal. Aumento original: 100x; H.E..... 80

Figura 14 – **Diabetes 14 dias**. Fotomicrografia exibindo necrose do tecido pulpar (asterisco), reabsorção radicular (*setas pretas*), reabsorção do tecido ósseo e invaginação do epitélio juncional

(seta azul) para a região de furca do elemento dentário movimentado (a e b). Aumento original: 100x; H.E..... 81

Figura 15 – **Diabetes-Laser 14 dias**. Fotomicrografia exibindo região do 1º molar inferior (a) mostrando papila interproximal entre os 1º e 2º molar ES inferiores (b) e furca do 1º molar inferior com aspecto normal. Aumento original: 100x; H.E..... 83

Figura 16 – **Diabetes-Laser. 14 dias**. Fotomicrografia exibindo regiões interproximal, entre os 1º e 2º molares inferiores (a) e de furca (b) em diferentes animais diabéticos tratados com radiação laser. Aumento original: 100x; H.E..... 84

Figura 17 – **Controle 21 dias**. Fotomicrografias das regiões interproximal, entre os 1º (esquerdo) e 2º (direito) molares inferiores (a, b, c), e de furca do 1º molar inferior (a', b' e c') de ratos saudáveis, após movimentação ortodôntica. Aumento original: 50x; H.E..... 86

Figura 18 - **Laser 21 dias**. Fotomicrografias das regiões interproximal, entre os 1º (esquerdo) e 2º (direito) molares inferiores (a, b, c) e de furca do 1º molar inferior (a', b', c') de diferentes ratos saudáveis, após movimentação ortodôntica. Aumento original: 50x; H.E..... 88

Figura 19 – **Laser 21 dias**. Fotomicrografias das regiões interproximal, entre os 1º (esquerdo) e 2º (direito) molares inferiores (d, e), e de furca do 1º molar inferior (d', e') de diferentes ratos saudáveis, após movimentação ortodôntica. Aumento original: 50x; H.E..... 89

Figura 20 – **Diabetes 21 dias**. Aspectos histológicos variáveis da região interproximal (a, b e c), entre os dentes 1º (direito) e 2º molares inferiores de diferentes ratos diabéticos, após

movimentação ortodôntica. Aumento original: 50x; H.E..... 91

Figura 21 – **Diabetes 21 dias**. Aspectos histológicos da região de furca do 1º molar inferior movimentado de ratos diabéticos.

Aumento original: 50x; H.E..... 92

Figura 22 – **Diabetes-Laser 21 dias**. Fotomicrografias exibindo preservação do periodonto de sustentação entre os 1º e 2º molares inferiores (a) com formação de tecido ósseo nas regiões interproximal (b) e de furca (c) de ratos diabéticos, após movimentação ortodôntica e tratamento com radiação laser.

Aumento original: 50x e 100x; H.E..... 94

Figura 23 – **Diabetes-Laser. 21 dias**. Fotomicrografias das regiões interdental, entre os 1º e 2º molares inferiores (a, b, c) e de furca do 1º molar inferior (a', b', c') de diferentes ratos diabéticos, após movimentação ortodôntica e tratamento com radiação laser. Aumento original: 50x; H.E..... 95

Figura 24 - Fotomicrografia exibindo osteócitos imunorreativos para OPN (a) e osteócitos não imunorreativos (b), localizados no terço médio da parede do tecido ósseo alveolar, adjacente ao ligamento periodontal (LP)..... 96

Figura 25 - Representação gráfica dos valores médios do número de osteócitos imunorreativos ou não para OPN, em todos os grupos estudados..... 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teste de Tukey da medida linear (pixel) entre a junção amelo-cementária da face distal do 1º molar inferior e a junção amelo-cementária da face mesial do 2º molar inferior, do lado direito, após movimentação ortodôntica, em todos os grupos estudados. Nível de significância estatística (P).....	64
Tabela 2 – Análise de variância (ANOVA), referentes à medida linear (pixel) entre a junção amelo-cementária da face distal do 1º molar inferior e a junção amelo-cementária da face mesial do 2º molar inferior, do lado direito, após movimentação ortodôntica, em todos os grupos estudados (n=5).....	64
Tabela 3 – Teste de Tukey dos resultados histomorfométricos da imunohistoquímica, referentes aos osteócitos imunorreativos ou não para OPN, após movimentação ortodôntica, em todos os grupos estudados. Nível de significância estatística (P).....	97
Tabela 4 – Análise de variância (ANOVA), referentes ao número de osteócitos imunorreativos ou não para OPN, após movimentação ortodôntica, em todos os grupos estudados (n=3).....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

λ = Comprimento de onda

μm = Micrômetro

AGEs = Advanced Glycolization Endproducts

Alp = Alkaline Phosphatase

AsGa = Arseneto de Gálio

AsGaAl = Arseneto de Gálio e Alumínio

ATP = Adenosina Trifosfato

β = Beta

BSA = Albumina Bovina

cbfa-1 = Core binding factor alpha 1

CCD = Charge Coupled Device

CKD = Quinase dependente de Ciclina

cm^2 = Centímetro quadrado

cN = CentiNewton

Col1 = Constans like 1

CSF1 = Colony stimulating factor 1 receptor

DAB = Diaminobenzidina

DHCC = Dihidroxicalciferol

DM = Diabetes Mellitus

DNA = Ácido desoxirribonucléico

DP = Doença Periodontal

ex. = Exemplo

FGF = Fibroblast Growth Factor

gr = Grama

(C) = Grupo controle

(D) = Grupo diabético

(D-L) = Grupo diabético laser

H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio

HbA1c = Concentração de hemoglobina glicosilada

HeNe = Hélio – Neônio

IGF-1 = Insulin-like Growth Factor 1

IM = Intra muscular

J = Joules

J/cm² = Joules por centímetro quadrado

Kg = Quilograma

(L) = Grupo laser

l = Litro

LASER = Light Ampliation by Stimulated Emission of Radiation

LBP = Laser de Baixa Potência

LSAB+Sys = Sistema Biotina e Estreptavidina

LT-4 - Levotiroxina 4

mg = Miligrama

mg/dL = Miligramas por decilitro

mg/kg = Miligramas por quilogramas

min = Minutos

ml = Mililitro

mm² = Milímetros quadrado

MO = Movimentação Ortodôntica

Mol/L = Mol por litro

mw – MiliWatts

N = Newton

NaCl = Cloreto de sódio

Nd:YAG = Neodymium-doped yttrium aluminium garnet; Nd:Y₃Al₅O₁₂

Niti = Níquel-titânio

nm = Nanômetro

Ocn = Osteocalcina

OMS = Organização Mundial de Saúde

OPN = Osteopontina

PCR = Polymerase Chain Reaction

RAGEs = Receptor for Advanced Glycozilation Endproducts

Rankl = Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

RunX2 = Runt-related transcription factor 2

SP = São Paulo

TEM = Tratamento de expansão de maxila

Tnfa = Tumor necrosis factor alpha

TRAP = Tartrate-resistant acid phosphatase

U = Unidade de insulina

W/cm² = Watts por centímetro quadrado

Sousa AGV. Efeitos da radiação laser Arseneto de Gálio e Alumínio (780nm) no periodonto de sustentação de ratos diabéticos durante movimentação ortodôntica: análises radiográfica e histológica [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

Diabetes Mellitus (DM) é considerado uma epidemia mundial, suas complicações implicam em alterações sistêmicas generalizadas. Concomitantemente cresce a acessibilidade e adesão da população brasileira, incluindo pacientes diabéticos, ao tratamento ortodôntico devido à modernização dos aparelhos ortodônticos e a conscientização das vantagens estéticas e funcionais deste tratamento. Este trabalho avaliou as alterações dos tecidos periodontais durante a movimentação ortodôntica com forças leves (20cN) em ratos diabéticos induzidos por aloxano, aplicando radiação laser diodo de Arseneto de Galio e Alumínio (780nm) com densidade de energia de 20J/cm². Foram utilizados 60 ratos divididos em 4 grupos: Controle, Laser, Diabético, Diabético-Laser, avaliados aos 7, 14 e 21 dias de movimentação ortodôntica. Realizou-se as análises radiográfica e imunohistoquímica da osteopontina para mensurar a movimentação ortodôntica. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que a movimentação ortodôntica foi maior no grupo Diabético do que nos demais grupos, entretanto a qualidade da microarquitetura periodontal foi indesejável; a laserterapia aplicada no grupo Diabético-Laser submetidos à movimentação ortodôntica, promoveu melhor preservação e integridade da microarquitetura dos tecidos periodontais quando comparado ao grupo Diabético, todavia foi semelhante aos resultados histológicos do grupo Controle; o número de osteócitos imunorreativos para a osteopontina foi maior no grupo Laser do que no grupo Diabético.

Palavras-chave: Diabetes mellitus. Periodonto. Ortodontia. Laser AsGaAl.

Sousa AGV. *Effect of the density Gallium Aluminum Arsenide ($\lambda = 780\text{nm}$) laser irradiation in the periodontium of diabetic rats after orthodontic movement: radiographic and histological and analysis [dissertation].* São José dos Campos: São José dos Campos Dental School, Unesp – Univ Estadual Paulista; 2011.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is considered a worldwide epidemic, its complications involve generalized systemic changes. At the same time increases the accessibility and adherence of the population, including diabetic patients, orthodontic treatment due to the modernization of orthodontic appliances and awareness of the aesthetic and functional advantages of this treatment. This study evaluated changes in periodontal tissues during orthodontic tooth movement with light forces (20cN) in alloxan-induced diabetic rats, using laser radiation diiodo of gallium arsenide and aluminum (780nm) with energy density of $20\text{J}/\text{cm}^2$. We used 60 mice divided into four groups: Control, Laser, Diabetic, Diabetic Laser-assessed at 7, 14 and 21 days of orthodontic movement. We conducted the analysis of radiographic and osteopontin immunohistochemistry to measure the orthodontic movement. Considering the results obtained, it can be concluded that orthodontic movement was higher in the diabetic group than in the other groups, but the quality of periodontal microarchitecture was undesirable; laser therapy applied in the diabetic group, submitted to Laser Tooth movement, promoted better preservation and integrity of the microarchitecture of the periodontal tissues when compared to diabetic group, but was similar to the histological results of the control group, the number of osteocytes immunoreactive for osteopontin was higher in the laser group than in the diabetic group.

Keywords: Diabetes mellitus. Periodontium. Orthodontics. GaAlAs laser.

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é um distúrbio metabólico crônico dos carboidratos, classificado como uma epidemia pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Os índices de prevalência desta patologia estima-se em cerca de 12% da população brasileira. Sua incidência vem aumentando 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. Tem por característica a hiperglicemia e glicosúria, resultantes da falta de produção, utilização inadequada da insulina ou por resistência a sua ação. Dentre os principais fatores de risco destacam-se a hereditariedade e a obesidade. (Alves *et al.*, 2007; Maraschin *et al.*, 2010).

O DM é classificado em Tipo1, Tipo2, gestacional e outros tipos específicos. Os tipos mais comuns são: o Tipo 1 resultado 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 alterações multifatoriais e mutagênicas decorrentes do diabetes levam à várias complicações sistêmicas que primariamente são assintomáticas evoluindo silenciosamente e atingindo todos os órgãos e sistemas do organismo . Importantes complicações clássicas podem ocorrer, destacando-se a microangiopatia, retinopatia, neuropatia, nefropatia, retardo na cicatrização de feridas e periodontopatias (Rodrigues *et al.*, 2010). Sendo assim, a assistência odontológica em portadores de

DM deve abranger todas as competências inclusas dentro de um plano de tratamento, que vise uma melhor condição bucal.

Dentro deste contexto a ortodontia em pacientes diabéticos é um assunto pouco pesquisado, diante da grande procura destes pacientes por esse tipo de tratamento. Uma vez que, a movimentação dentária induzida envolve uma série de alterações que culminam com a reabsorção no tecido ósseo no lado de pressão e aposição no lado de tensão, o equilíbrio fisiológico iônico deste tecido deve estar em constante observação (Viera *et al.*, 2008; Vila Real *et al.*, 2009).

Uma vez que a movimentação dentária envolve processos de reabsorção e neoformação óssea, o conhecimento da fisiologia deste movimento e a avaliação da estrutura óssea no paciente portador de DM, tornam-se condição imprescindível para realização de um tratamento ortodôntico seguro. Os distúrbios metabólicos que acometem os pacientes diabéticos associados às velocidades de reabsorção e neoformação óssea, bem como a relação destas com a doença periodontal devem ser relevantes quando da indicação ao tratamento ortodôntico.

Vários estudos têm procurado alternativas de melhorar o processo de regeneração óssea, e uma das ferramentas mais utilizada nas pesquisas contemporâneas vem sendo a radiação laser de baixa potência, pelos mecanismos de bioestimulação, no qual a energia absorvida pelas células não ultrapassa o limiar de sobrevivência celular, favorece uma série de reações que induzem a síntese de enzimas. A radiação absorvida pelos tecidos provoca efeitos primários ou diretos nos quais incluem efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos (Sá *et al.*, 2010).

Como o processo do metabolismo ósseo na DM apresenta-se alterado, a aplicação da radiação laser de baixa potência durante a movimentação ortodôntica pode ser de grande valia, uma vez que, seus efeitos biomoduladores celulares podem favorecer os processos reparativos do tecido ósseo em pacientes diabéticos.

Diante deste contexto e em decorrência de uma maior frequência de pacientes diabéticos nos consultórios odontológicos à procura de tratamento ortodôntico, nos motivou a realizar o presente trabalho, com o objetivo de estudar os efeitos da radiação laser Arseneto de Gálio Alumínio (AsGaAl), com comprimento de onda de 780nm e densidade de energia 20 J/cm², no periodonto de sustentação de ratos diabéticos, submetidos à movimentação ortodôntica com forças leves (20cN).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura foi realizada de maneira a direcionar o leitor a obter conceitos básicos e necessários, que promovessem o entendimento e discernimento para os contextos deste estudo. Portanto, alguns subitens deste capítulo, foram descritos por relevância de assunto e não por ordem cronológica.

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. A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica o Diabetes mellitus (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 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).

Este distúrbio no metabolismo de carboidratos é resultado de uma insuficiência absoluta ou relativa de insulina, causada pela ausência ou deficiência de sua produção pelo pâncreas e resposta dos

tecidos periféricos a este hormônio. Os principais sintomas da referida doença, não controlada, são polidipsia, polifagia, poliúria e perda de peso, cansaço e irritabilidade. Além das complicações no metabolismo, os indivíduos portadores desta patologia podem desenvolver complicações vasculares, neurológicas e infecciosas severas decorrentes da alteração do sistema imunológico (Sonis et al., 1985; Bensch et al., 2004)

O DM pode ser classificado em vários tipos clínicos, como os tipo 1 e 2 sendo os mais comuns, gestacional, devido a distúrbios genéticos, medicamentoso, imunomediados entre outros. O *tipo 1*, resultante da destruição das células β pancreáticas, pode ser subdividido em *1a* e *1b*, caracterizando-se como uma doença auto-imune específica devido à presença de anticorpos anti-células β pancreática. Nesta condição, há um aparecimento abrupto dos sintomas, insulinopenia, dependência de insulina exógena, propensão à cetoacidose. O *tipo 2* exibe graus variáveis de resistência e/ou deficiência da secreção de insulina. Frequentemente, este tipo apresenta discretos sintomas relacionados ao problema metabólico, tendo início, normalmente, após 35 anos de idade. Além disso, os indivíduos podem ou não depender de insulina caso a dieta e/ou a medicação por via oral não controlem a hiperglicemia. Ressalva-se que, normalmente, o *tipo 2* está associado à resistência à insulina produzida e a perda de função das células β pancreáticas (Bensch et al., 2004; Reinehr et al., 2006; American Diabetes Association, 2009; Maraschin et al., 2010; Rodrigues et al., 2010).

Os critérios para determinar 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 glicosilada e hemoglobina glicosilada (*HbA1c – glycosylated hemoglobin concentration*, valor de normalidade 4

a 6 %), sendo, este último, o melhor método de controle para um intervalo de tempo médio de 3 meses (Ship, 2003; Alves et al., 2006).

As complicações da DM podem ser de ordem metabólica, como a intolerância à glicose, metabolismo anormal das proteínas e dos ácidos graxos com cetoacidose. O resultado deste desordem metabólica refletem-se em sintomas gastrointestinais, como náusea e vômito, instabilidade cardiovascular, desidratação, alteração no estado mental, coma e morte (Vernillo et al., 2001; 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. Estas células podem obliterar o lúmen vascular decorrente do aumento da espessura da parede de vasos sanguíneos e espessamento da membrana basal, promovendo a diminuição do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, a diminuição a oxigenação celular, além de acúmulo de resíduos metabólicos, desenvolvendo a microangiopatia em todos os tecidos (Lorenzi 1992, Guggliucci 2000, Kawamura, Magalhães 2002, 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).

Os quadros de hipoglicemia são complicações agudas freqüentes em pacientes diabéticos, sendo considerada abaixo de 70 mg/dL, podendo ocorrer devido à ação de medicamentos hipoglicemiantes (ex: insulina, sulfoniluréias), excesso de atividades físicas e/ou ingestão dieta inadequada. A sintomatologia da hipoglicemia severa são de fraqueza, aumento da irritabilidade, tremores, palpitação, sudorese excessiva, letargia, agitação e confusão, podendo evoluir ao coma e morte. O tratamento consiste na administração imediata de

glicose ou dextrose aquosa a 5% via enteral e endovenosa, respectivamente (Alves et al., 2006).

A DM promove, também, alterações da microarquitetura do tecido ósseo de portadores de diabetes, causando osteopenia e osteoporose. Ratifica-se que a ausência parcial ou total da insulina favorece o déficit da produção de colágeno e de matrizes ósseas e cartilaginosas, decorrente da não ação efetiva desse hormônio sobre as superfícies das células de origem mesenquimal, fibroblastos, osteoblastos e condrócitos por diversos fatores intrínsecos (Verhaeghe e Boullion, 1996).

Na evolução do processo de reparação tecidual, a insulina apresenta um importante papel na fisiobiologia deste processo. Este hormônio é responsável pela redução da glicemia ao promover o ingresso de glicose nas células, 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 e Hall, 1997; Carvalheira et al., 2002; Melgaço, 2002; Madeiro et al., 2005).

2.1.1 Doença Periodontal no DM

A sexta complicação sistêmica da DM e a manifestação bucal mais freqüente nos indivíduos diabéticos é a doença periodontal (Lalla et al., 2000). Esta enfermidade ocorre devido ao retardo do

processo de regeneração óssea, alterações do ligamento periodontal e distúrbios vasculares, como microangiopatias, presentes no tecido conjuntivo da gengiva (Holtgrave e Donath, 1989).

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 agravar o controle metabólico em pacientes portadores do diabetes (Nagasawa et al., 2010).

O ligamento periodontal de pacientes diabéticos há consideráveis alterações na morfologia e distribuição das fibras de Sharpey, sendo observada redução no tamanho da parte não mineralizada das fibras, resultante do aumento da área de mineralização. Isto ocorre devido à redução no *turnover* de colágeno, promovendo menor resiliência e maior rigidez do periodonto, além da diminuição da dissipação de forças durante a mastigação. Este fato causa perda da ancoragem alveolar, resultando, principalmente, na diminuição da altura da crista alveolar (Johnson, 1992).

Nas análises histológicas, autores têm descrito diminuição da atividade osteoblástica e, conseqüentemente, redução do número de osteócitos. O déficit de matriz óssea, também, ocorre devido à diminuição da concentração plasmática de osteocalcina, colágeno tipo I e do fator de crescimento insulina (*IGF-1 - Insulin-like Growth Factor 1*) e fator de crescimento fibroblástico (*FGF - Fibroblast growth Factor*), promovendo nas alterações na microarquitetura do tecido ósseo e no *turnover* ósseo e, conseqüentemente, repercutindo na fragilidade do osso de indivíduos

portadores do DM (Lu et al., 2003; Heap et al., 2004; Abassy et al., 2010). Considera-se, ainda, que a ausência, quantidade insuficiente e/ou perda da ação da insulina promovem diminuição de número e redução do espessamento das trabéculas ósseas, favorecendo a osteoporose severa (Thrall et al., 2005; Heap et al., 2004).

Outra evidência relevante, destes indivíduos, é o retardo no processo de reparação óssea. Nesta condição, ocorreriam mudanças nos componentes da matriz extracelular e do metabolismo ósteo-mineral, causadas pelos produtos finais da glicolização avançada (AGEs- *Advanced Glycolization Endproducts*). Esse processo AGEs é caracterizado pelo resultado de uma reação entre os produtos Amadore com as outras moléculas, resultado da interação reversível entre os metabólitos da glicose com as proteínas responsáveis pela formação das bases de Schiff ou Amadore. Além disso, possuem receptores altamente específicos (RAGES- Receptor for Advanced Glycation Endproducts) em células alvo, como células endoteliais, neurais e monócitos. A associação dos AGEs com seus receptores estimula a produção excessiva por macrófagos de mediadores inflamatórios que estimulam a transformação do colágeno em compostos menos solúveis, mais resistentes a ação de enzimas e menos flexíveis, o que contribui para a dificuldade de reparação tecidual, além de ativar osteoclastos e a collagenase, conduzindo à destruição dos tecidos ósseo e conjuntivo, respectivamente, aumentando a progressão e severidade da doença periodontal (Gregg et al., 2002; Gugliucci, 2000).

O aumento das AGEs ocorre, concomitantemente, com o aumento da glicemia, sendo um fenômeno patognomônico em indivíduos portadores do diabetes (Fiorellini et al., 1999). De acordo com este autor, as AGEs causam mudanças qualitativas e quantitativas nos componentes da matriz extracelular, tais como: colágeno, proteoglicanas e laminina, comprovando a sua relação com a patologia do diabetes. Além disso,

ocorre diminuição no número total de proteoglicanas, bem como do tamanho das moléculas agregadas. Portanto, essas mudanças na matriz extracelular determinam alterações específicas na formação e remodelação óssea (Fiorellini et al., 1999; Lalla et al., 2000; Ramasamy et al., 2005).

2.2 Ortodontia

A ortodontia se apóia em fatores biológicos e mecânicos, caracterizada por reações sequenciais do tecido periodontal em respostas às forças aplicadas (Proffit, 2002). A quantidade e qualidade da movimentação dentária, depende da capacidade de resposta das células do periodonto aos estímulos mecânicos, os quais geram alterações teciduais. Os referidos estímulos em conjunto com mediadores químicos, como citocinas e prostaglandinas, sintetizadas e secretadas por células locais, ativam os osteoblastos e osteoclastos. Células, estas, responsáveis pela formação e reabsorção de matriz óssea, respectivamente.

A harmonia do processo de remodelação óssea, de aspecto normal, durante a movimentação dentária, sem prejuízos das estruturas biológicas do periodonto, é descrita na ortodontia pela “Teoria da Pressão-Tensão” (Götz, 2006; Misawa et al., 2007; Henneman et al., 2008). Nesta teoria, 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. 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 e Bozzo, 1989; Henneman et al., 2008).

No lado de pressão, aos dentes tracionados com força ortodôntica ideal, apresentam discreto infiltrado de células inflamatórias e alterações da camada odontoblástica, além da presença de vasos sanguíneos congestos no tecido pulpar. É importante salientar que estas alterações são reversíveis, se a agressão não for de caráter patológico (Gibson et al., 1992; Ashizawa e Sahara, 1998).

A força ortodôntica aplicada nos períodos de 6 a 12 horas, promove intensa atividade de osteoclastos, resultando na reabsorção do tecido ósseo alveolar e, simultaneamente, a desintegração de fibras colágenas. Considerando o período entre 24 a 48 horas, é descrito neoformação vascular, proliferação celular do tecido conjuntivo e formação e remodelação do tecido ósseo neoformado. Após 96 horas, há presença de espaços medulares entre as trabéculas ósseas, preenchidos por tecido conjuntivo (Moraes et al., 2002).

Nos casos de forças ortodônticas intensas em indivíduos com distúrbios metabólicos ósseos, são denotadas intensas reabsorções ósseas no tecido ósseo alveolar e acentuada presença de tecido necrótico no ligamento periodontal do lado da pressão, com característica asséptica, exibindo aspecto hialino. Entretanto, nas adjacências desta área, há numerosos fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos, células endoteliais, mesenquimais e inflamatórias presentes no ligamento periodontal, importantes para a reparação tecidual. Ressalva-se que não ocorre movimentação dentária, em condições fisiopatológicas, enquanto

as áreas hialinas não forem eliminadas (Reitan, 1985; Consolaro, 2002; Verna e Melsen, 2003; Henneman et al., 2008).

2.2.1 Fatores sistêmicos associados à movimentação ortodôntica

A influência da movimentação dentária no metabolismo ósseo efetiva é demonstrada pela resposta fisiopatológica do tecido ósseo, frente às forças ortodônticas ideais. As anormalidades na remodelação óssea ocorrem em algumas das complicações mais comuns do DM, tais como: osteoporose, periodontite, insuficiência renal crônica, artrite, dentre outras. Entretanto, na maioria dos casos, pouco se sabe sobre os mecanismos responsáveis pela disfunção desta anormalidade (Weiland, 2003; Gimenez et al., 2007).

Verna et al. (2003) avaliaram ratos com alteração no metabolismo ósseo, induzidos pelo princípio ativo LT-4. Estes animais foram divididos em três grupos: metabolismo ósseo normal ou controle, alto metabolismo ósseo e baixo metabolismo ósseo. Em seguida, Foi aplicada uma força ortodôntica constante de 25 cN, durante três semanas. Neste estudo, verificou-se que o metabolismo ósseo influenciou na movimentação dentária. A taxa de movimentação ortodôntica foi elevada nos ratos que apresentavam alto metabolismo ósseo, enquanto que, nos ratos com baixo metabolismo ósseo, houve diminuição na taxa. Os pesquisadores constataram que as alterações metabólicas no tecido ósseo influenciaram na resposta tecidual frente às forças ortodônticas. Portanto, pacientes portadores de doenças metabólicas ósseas, como osteoporose, hiperparatireoidismo, insuficiência renal crônica ou distúrbios metabólicos causados por medicação devem ser cuidadosamente

avaliados, para que o planejamento e tratamento ortodôntico ocorram de forma adequada e efetiva.

Feng (2006) estudou a remodelação periodontal em ratos diabéticos, submetidos à força ortodôntica de 30 cN. Os 60 animais foram utilizados e divididos em 2 grupos: ratos normoglicêmicos (C) e ratos diabéticos (D), os quais foram sacrificados no 0, 3, 7, 14 e 21 dias. O autor verificou aumento significativo de movimentação ortodôntica no grupo D quando comparado com o grupo C. Além disso, a diminuição de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos nos grupos D foi bem evidenciada, sugerindo que o DM favoreceu negativamente uma acentuada movimentação ortodôntica devido ao déficit nas respostas dos tecidos periodontais.

Tominaga (2007) estudou, histopatologicamente, os efeitos da força ortodôntica de 10 cN em ratos diabéticos, geneticamente modificados, tratados com insulina (2 a 6 U). Sessenta e quatro ratos diabéticos foram utilizados e divididos em três grupos: ratos normoglicêmicos (Controle) ratos diabéticos compensados (A) e não compensados (B). Estes foram avaliados mediante análise das concentrações de níveis séricos de frutamina. Após 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 e 28 dias, os animais foram sacrificados e a região do 1º molar superior, submetida à movimentação ortodôntica durante 14 dias, foi retirada e analisada, mediante microscópio de luz. A quantidade de movimentação ortodôntica foi significativamente menor nos grupos diabéticos compensados e não compensados quando comparado com o grupo controle. Dentre os grupos diabéticos, verificou-se que a referida distância apresentou aumento significativo nos animais compensados ($P < 0,05$). Nos ratos diabéticos compensados, os processos de reabsorção e formação óssea, nos lados de pressão e tensão, respectivamente, tornou-se mais efetivos do que nos ratos diabéticos não compensados, a partir do 5º dia de

movimentação ortodôntica. A reação dos tecidos periodontais nos animais do grupo controle foi mais adequada nas condições fisiopatológicas do que nos grupos diabéticos compensados ou não. Diante disso, os autores sugerem que a reabsorção óssea, formação óssea e remodelção óssea seguida da movimentação ortodôntica foi retardada, independentemente, dos níveis glicêmicos de pacientes diabéticos compensados ou não.

Hiraoka (2007) avaliou os efeitos da movimentação ortodôntica com forças leves (10 cN) em periodonto de ratos diabéticos. Foram utilizados 36 animais divididos em dois grupos: controle (C) e diabético (D). Foi instalada uma mola ligando o primeiro molar inferior direito ao incisivo inferior do mesmo lado em todos os animais e os períodos de observação foram de 7, 14 e 21 dias. Os autores observaram que nos animais diabéticos houve severa perda óssea, além de áreas de necrose, hipercementose e lesões de furca, principalmente aos vinte e um dias. Diante desses resultados, concluíram que, em ratos diabéticos não controlados, a movimentação ortodôntica exerce um efeito deletério maior ao periodonto do que em ratos normoglicêmicos.

Vila Real et al. (2009) estudaram as modificações do ligamento periodontal de incisivos de ratos diabéticos submetidos 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. Em seguida, 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.

Villarino et al. (2011) avaliaram a resposta do tecido ósseo em ratos diabéticos tratados e não tratados com insulina, submetidos à aplicação de força ortodôntica. Foram utilizados 24 animais, submetidos à movimentação ortodôntica, sendo divididos em três grupos: ratos normoglicêmicos, ratos diabéticos e ratos diabéticos tratados com insulina. Estes animais foram sacrificados 2 dias após a aplicação da força ortodôntica transversal, envolvendo os 1^{os} molares superiores. A região dos 1^{os} molares foi analisada histologicamente, sendo mensurado o número de osteoblastos. Foi constatado que houve diminuição na formação e reabsorção de tecido ósseo em ratos diabéticos quando comparado com os ratos normoglicêmicos. O volume de tecido ósseo interradicular dos ratos normoglicêmicos e diabéticos tratados com insulina, submetidos à movimentação ortodôntica, não apresentou significância estatística. Nesta pesquisa, pode-se concluir que pessoas com diabetes não devem ser submetidas a tratamento ortodôntico até a estabilidade de seu estado metabólico. A resposta do tecido ósseo em indivíduos tratados com insulina e indivíduos saudáveis, frente às forças ortodônticas, não difere.

Braga et al. (2011) afirmam que a movimentação dentária ocorre por meio de remodelação óssea alveolar frente à resposta de uma força ortodôntica. Esses autores 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 imuno-reativos para TRAP do que os encontrados em camundongos normoglicêmicos. Este achado estava relacionado com a expressão aumentada dos Rankl, CSF1, CCL2, CCL5 e Tnfa, envolvidos na atividade e recrutamento de osteoclastos em camundongos diabético tratados com insulina. Além disso, a expressão de marcadores osteoblásticos (Runx2, Ocn, Col1 e Alp) estava diminuída em camundongos diabéticos tratados com insulina. 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. Laser de Baixa Potência (LBP)

O laser é considerado uma fonte que utiliza a luz por um átomo ou molécula para estimular a emissão de mais luz por outros átomos ou moléculas e, neste processo, amplificar a luz original (Ferreira, 2006).

O termo laser é acrônimo da língua inglesa que significa *Light Ampliation by Stimulated Emission of Radiation*. 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 1988, 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 e acima de 760 nm, a luz é denominada de ultravioleta e infravermelha, respectivamente, ambas não visíveis pelo homem (Miserendino e Pick, 1995).

A interação entre radiação laser e reparação tecidual pode gerar efeitos biomoduladores e bioestimuladores, dependendo do comprimento de onda, densidade de potência, tempo de irradiação e afinidade com o tecido irradiado. Destarte, a referida radiação pode agir como balanceador e biorregulador de funções celulares, uma vez que pode ser utilizada, tanto como estimulador quanto inibidor do metabolismo celular. A energia laser proporciona às células e tecidos um aumento no trofismo, normalizado as deficiências e equilibrando as desigualdades (Bjordal et al., 2003; Wash, 2003).

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 utilizado sem riscos para o paciente, além de não apresentar contra indicação (Damante et al., 2004; Nícoli et al., 2006).

Pode-se afirmar que o tratamento com laser de baixa potência é um tipo de terapia não invasiva, indolor, não térmica e asséptica. Além disso, pode apresentar propriedade de indução fotobiológica, sendo capaz de provocar alterações bioquímicas, bioelétricas e bioenergéticas nas células. Em adição, a radiação laser de baixa potência pode atuar de duas formas, tais como: estimula liberação

de histamina, serotonina, bradicinina e heparina e modifica as reações enzimáticas normais que atuam na inibição e estimulação celular (Karu, 1999; Pinheiro e Gerbi, 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 (Yuet al., 1997; Karu, 1999).

Ninomiya (2007) e Ozawa et al. (1998) estudaram, *in vitro*, os efeitos da radiação laser Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) em células semelhante aos osteoblastos, nos diferentes estágios celulares, de calvária de ratos. As referidas células foram isoladas em 16 placas. Cada placa foi submetida à radiação laser AsGaAl, com comprimento de onda de 830 nm e potência 500 mW, por uma única vez em dias consecutivos, sendo a primeira placa irradiada no dia 1 e a décima sexta no dia 16. Os autores verificaram que a radiação laser AsGaAl promoveu melhora na atividade da fosfatase alcalina e na expressão do gene da osteocalcina. Apenas nos primeiros dias de aplicação, houve maior número e área de nódulos ósseos. Portanto, os autores sugerem que a radiação laser de baixa potência pode apresentar duas funções principais na formação óssea estimulada pela laserterapia. A primeira caracteriza-se pela estimulação da proliferação celular, especialmente de células de linhagem osteoblástica, formadora de nódulos. A segunda mostra estimulação de diferenciação celular, especialmente as precursoras, resultando no aumento significativo do número de células semelhantes aos osteoblastos diferenciadas e da formação óssea. Ambas as funções de estimulação celular e formação

óssea podem ser exibidas pela radiação laser em células imaturas isoladas.

Kriesler et al. (2003) analisaram, *in vitro*, diferentes densidades de energia da radiação laser AsGaAl, com comprimento de ondas de 809 nm e potência de 10mW, em fibroblastos do ligamento periodontal de humano. As densidades 1,96, 3,92 e 7,84 J/cm² foram obtidas a partir dos tempos selecionados de 75, 150 e 300 segundos, respectivamente, mediante auxílio da calibragem automática do equipamento laser utilizado. O ligamento periodontal foi obtido do tecido remanescente e aderido as raízes do 3º molar inferior, com indicação para extração. Este material biológico coletado foi cultivado em meio de cultura para fibroblastos. Após 24 horas de cultivo, as placas de petri, contendo os fibroblastos, foram irradiadas com as diferentes densidades de energia, sendo considerados grupos tratados. As placas não irradiadas foram consideradas grupo controle. Neste estudo, os autores puderam concluir que não houve diferença significativa da atividade de proliferação celular de fibroblastos entre os grupos tratados (1,96, 3,92 e 7,84 J/cm²). Todavia, entre os grupos tratados e controle, constatou-se aumento estatisticamente significativo desta atividade em células irradiadas, independentemente da densidade de energia utilizada.

Segundo Shimizu et al. (2007) a avaliação, *in vitro*, os efeitos da radiação laser AsGaAl (830nm), por 10 minutos, com densidade de energia de 3,82 J/cm², em células semelhantes a osteoblastos, cultivadas com o fator de crescimento de insulina – 1 recombinante (rIGF-1 – *recombinant Insulin-like Growth Factor 1*), estimulador na formação óssea por meio de proliferação e diferenciação celular. Os resultados foram obtidos a partir das análises do número e quantidade de área de formação de nódulos ósseos, bem como a intensidade de expressão de gene e produção de IGF-1. Diante disso, os estudiosos puderam verificar que as células semelhantes aos

osteoblastos, cultivadas com rIGF-1, estimularam significativamente o número e área de nódulos ósseos. A radiação LBP estimulou a produção e expressão do gene IGF-1, promovendo o aumento do número e tamanho dos nódulos ósseos.

2.3.1 LBP e DM

Devido à carência de trabalhos científicos em relação à aplicação do laser de baixa potência (LBP) no periodonto em indivíduos portadores do DM, em seus aspectos histológicos, não foi considerado apenas a região de periodonto e tipos de tecido e LBP. Entretanto, trabalhos mostram efeitos benéficos da terapia com radiação laser de baixa intensidade no processo de reparação tecidual em diabético.

Yu et al. (1997) estudaram, histologicamente, os efeitos da radiação laser de baixa potência (LBP), com comprimento de onda de 632 nm, densidade de energia de 5 J/cm² e potência de 20 mW, em feridas cruentas provocadas no dorso de camundongos diabéticos, geneticamente modificados. Quarenta camundongos foram utilizados e divididos em quatro grupos: camundongos sem quaisquer tratamentos (controle), camundongos tratados com bFGF (bFGF – basic fibroblast growth factor), camundongos tratado com radiação LBP e camundongo tratado com LBP e bFGF. O bFGF foi aplicado, localmente, sobre a ferida cruenta. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que a área da superfície ulcerada da pele foi menor nos animais tratados com laser do que nos tratados com bFGF. Este aspecto ocorreu devido ao efeito da radiação LBP na lesão provocada, resultando na estimulação da reepitelização tecidual, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno.

Reddy (2003), também, avaliou os efeitos da radiação laser Arseneto de Galio (AsGa), com comprimento de onda 904 nm, densidade de energia de 1 J/cm² no processo de reparação tecidual de em feridas cruentas provocadas em ratos diabéticos. A radiação laser AsGa foi aplicado 5 dias por semana durante 3 semanas. Diante dos resultados obtidos, o autor verificou que a radiação laser AsGa promoveu aumento de 14% na deposição de colágeno nas áreas da lesão provocada, quando comparada com a lesão não irradiada, resultando no aumento da resistência a tensões do tecido reparado. Além disso, foi sugerido que as diferentes respostas teciduais dependem do comprimento de onda e das propriedades eletromagnéticas da radiação laser.

Maiya et al. (2005) pesquisaram os efeitos da radiação laser Hélio e Neônio (HeNe), com comprimento de onda de 632,8 nm e densidade de energia de 4,8 J/cm², em feridas cruentas provocada, localizadas no dorso de ratos diabéticos induzidos por aloxano, mediante análises histológica e bioquímica. Quarenta e oito ratos diabéticos foram utilizados e divididos em 2 grupos: ratos diabéticos não radiados (controle) e ratos diabéticos irradiados (tratado). A radiação laser HeNe foi aplicado 5 dias por semana até o fechamento da ferida. Nesta pesquisa, constatou-se que a reparação tecidual ocorreu em 18 e 59 dias em ratos diabéticos irradiados e não irradiados, respectivamente. Histologicamente, os autores verificaram que houve aumento da proliferação de fibroblastos e de vasos sanguíneos e da reepitelização, além da maior formação de tecido de granulação nos ratos diabéticos tratados com HeNe, em relação ao grupo controle. Na análise bioquímica, constatou-se que os ratos diabéticos irradiados exibiam maior concentração de colágeno nos tecidos biópsiados da ferida cruenta, quando comparado com os ratos diabéticos não irradiados.

Almeida et al. (2008) analisaram a radiação laser de AsGaAl, com comprimento de onda de 660nm e densidade de energia de 4 J/cm^2 , na doença periodontal de ratos diabéticos induzidos com aloxano. Cento e vinte ratos foram utilizados e divididos em 2 grupos: ratos saudáveis e ratos diabéticos. A doença periodontal foi induzida por meio de inserção de ligadura no 1º molar inferior, durante 7 dias. Após este período, cada grupo de animais foi subdividido em 4 subgrupos, os quais estão relacionados com os tipos de tratamento de doença periodontal, preconizados nesta pesquisa. Os subgrupos foram tratamento com irrigação local com solução salina, tratamento com aplicação local com fenotiazina (10 mg/mL) e tratamento com aplicação local com fenotiazina (10 mg/mL) associada à radiação laser AsGaAl (terapia fotodinâmica). Em seguida, os animais foram sacrificados nos períodos de 7, 15 e 30 dias, sendo as peças cirúrgicas removidas e submetidas às análises clínicas e histológica. Diante dos resultados, os autores verificaram que os ratos saudáveis, submetidos à terapia fotodinâmica, mostraram menor perda de tecido ósseo em todos os períodos estudados, quando comparados com ratos diabéticos, tratados irrigação salina, fenotiazina e radiação laser AsGaAl. Os ratos diabético, submetidos à terapia fotodinâmica, mostravam menor quantidade de perda de tecido óssea, quando comparada com os seus demais subgrupos.

Bayat et al. (2009) estudaram os efeitos da radiação laser Hélio e Neônio (HeNe), com comprimento de onda de 632nm e potência de 10 mW), em fratura de tíbia em 20 ratos diabéticos, induzidos por estreptozotocina, mediante análises histológica e da força biomecânica. Vinte ratos foram utilizados e divididos em 2 grupos: ratos normoglicêmicos (S) e ratos diabéticos (D). Cada grupo de animais foi subdividido em 2 subgrupos, tais como: ratos saudáveis não irradiados (S1), ratos saudáveis submetido à radiação laser HeNe com $382,2 \text{ J/cm}^2$ (S2), ratos diabéticos submetido à radiação laser HeNe com $28,6 \text{ J/cm}^2$

(D1) e ratos diabéticos submetido à radiação laser HeNe com 382,2 J/cm² (D2). Os animais dos grupos S2 e D2 apresentaram melhores propriedades biomecânicas do osso quando comparado com os animais do grupo S1. A densidade das lamelas ósseas do tecido ósseo compacto foi melhor evidenciado no grupo D2 do que no grupo S1. Diante dos resultados, os autores puderam concluir a radiação laser HeNe aumentou a densidade das lamelas ósseas de osso compacto e, consequentemente, a resistência do tecido ósseo reparado a forças biomecânicas.

Akyol e Gungormus (2010) investigaram, histologicamente, os efeitos da radiação laser AsGaAl, com comprimento de onda de 808nm, densidade de energia de 10 J/cm², na reparação óssea de defeitos ósseos cirúrgicos em fêmur de ratos diabéticos induzido com estreptozotocina (50 mg/kg), mediante análise por microscopia de luz. Vinte e oito ratos foram utilizados e os fêmures obtidos foram divididos em três grupos: fêmur de ratos normoglicêmicos, fêmur de ratos diabéticos não irradiados e fêmur de ratos diabéticos irradiados. Ressalva-se que foram confeccionados dois defeitos ósseos em cada rato diabético, sendo um em cada fêmur. Esses animais foram sacrificados nos períodos de 10 e 20 dias e as peças cirúrgicas, contendo a região do defeito, foram analisadas por meio de microscopia de luz. As aplicações do laser AsGaAl ocorreu em dias alternados, até o sacrifício do animal. Os autores demonstraram que a quantidade de tecido ósseo espongiado foi discretamente mais elevada nos fêmures de ratos normoglicêmicos e de ratos diabéticos irradiados do que nos fêmures de ratos diabéticos não irradiados. Não houve diferença significativa entre os grupos, em relação à quantidade de medula óssea e formação de cortical óssea, em 10 dias de observação. As bordas dos defeitos cirúrgicos, tratados com radiação laser de baixa potência (LBP), mostravam-se mais unidas do que as dos demais grupos, em 20 dias de observação. Diante desses resultados, pode concluir que a radiação LBP tem um efeito benéfico no tecido ósseo

espongioso na reparação óssea de ratos diabéticos, quando se realizou a 5ª aplicação. Sugere-se que a radiação laser AsGaAl, com comprimento de onda de 808nm e densidade de energia 10 J/cm², pode ser utilizado, seguramente, na reparação óssea de pacientes diabéticos.

2.3.2 LBP e Movimentação Ortodôntica (MO)

Estudos afirmam que o tecido ósseo, irradiado com LBP, mostra aumento de proliferação osteoblástica, deposição de colágeno e neoformação óssea, quando comparado com tecido ósseo não irradiado. Sendo possível que os efeitos da radiação LBP, sobre a regeneração óssea, não dependa somente da dose total de irradiação, mas, também, do tempo e modo de irradiação. Nas diversas pesquisas estudadas, as avaliações do tipo e velocidade de movimentação ortodôntica em humanos são, freqüententes, realizadas, mediante análises clínicas e/ou imaginológicas, uma vez que o procedimento clínico-odontológico não é invasivo (Gregghi, 2006; Saito, Shimizu, 1997).

Cruz et al. (2004) estudaram, clinicamente, os efeitos da radiação laser AsGaAl, comprimento de onda de 780 nm e densidade de energia 5 J/cm², 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.

Limpanichkul et al. (2006) estudaram os efeitos da radiação laser AsGaAl (860 nm, 25 J/cm² e 100 mW) na movimentação ortodôntica para retração dos caninos superiores. Doze pacientes foram submetidos ao procedimento cirúrgico de extração dos 1^{os} pré-molares superiores. Posteriormente, realizou-se a ativação do dispositivo de retração para movimentação ortodôntica dos caninos. A aplicação da radiação laser nas faces vestibular, palatina e distal do canino direito, sendo 3, 3 e 2 pontos nas faces vestibular, palatina e distal, respectivamente, sendo considerado grupo tratado. O lado esquerdo, região não irradiada, foi considerado grupo controle. Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos irradiado e controle. Os autores acreditavam que este fato ocorreu devido à baixa dose de irradiação aplicada sobre os tecidos.

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 ou presença de biprotusões. Em seguida, o tratamento ortodôntico foi iniciado 14 dias após a extração dos pré-molares. O movimento de retração dos caninos foi realizada 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.

Saito e Shimizu (1997) investigaram os efeitos da radiação laser AsGaAl, (830 nm, 35,3 J/cm², 100 mW) na sutura palatina mediana de ratos, submetidos ao tratamento de expansão da maxila (TEM), mediante análise histológica. Setenta e seis ratos foram utilizado e divididos em 6 grupos:

- ratos sem TEM, não irradiado (A),
- ratos, com TEM, não irradiados (B),
- ratos submetidos ao TEM (radiação laser AsGaAl aplicado durante 7 dias, uma dose/dia por 3 ou 10 minutos) (C),
- ratos submetidos ao TEM por 3 dias (laser AsGaAl aplicado do 1º ao 3º dias, uma dose/dia por 7 minutos cada) (D),
- ratos submetidos ao TEM por 6 dias (laser AsGaAl aplicado a partir do 4º dia, uma dose/dia por 7 minutos cada) (E),
- ratos submetidos ao TEM (laser AsGaAl aplicado em dose única por 21 minutos) (F).

Os autores puderam concluir que todos os animais submetidos à radiação laser AsGaAl estimularam, significativamente, o processo de regeneração óssea na sutura mediana palatina, durante o tratamento de expansão da maxila, apresentando resultados mais eficientes, quando comparado com os animais não irradiados. Em adição, o efeito bioestimulador e biomodulador da radiação laser AsGaAl no processo de regeneração óssea mostrou-se mais efetivo nos 1ºs dias (1º ao 3º dia).

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 $5,25 \text{ J/cm}^2$ ($n=9$) e cães irradiados com 35 J/cm^2 ($n=9$). 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 $5,25 \text{ J/cm}^2$ do que nos irradiados com 35 J/cm^2 , tendo como referência a quantidade de movimentação dos cães do grupo controle.

2.4 Marcador imunohistoquímico

2.4.1 Osteopontina

A osteopontina é uma proteína não colágena produzida pelos osteoblastos e osteoclastos, sendo secretada na matriz extracelular óssea, bem como apresenta um importante papel na remodelação óssea fisiológica e induzida. Esta sialoproteína, altamente glicosilada e fosforilada, liga-se à hidroxiapatita e aos íons cálcio, por meio do ácido aspártico, atuando no processo de regulação da fase de mineralização (McKee e Nanci 1996; Giachelli e Steiz, 2000; Sodek et al., 2000; Denhardt et al., 2001).

Na remodelação óssea fisiológica, a OPN tem como função mediar à adesão de osteoclastos sobre o tecido ósseo durante a fase de reabsorção, bem como é secretada pelos pré-osteoblastos durante a fase de neoformação óssea. Apenas a osteopontina tem sua

expressão durante dois períodos: durante o período de proliferação ativa (a 25% a níveis máximos), e no período de mineralização. Em adição, atua como leito para formação de matriz óssea, além de ser uma proteína ligante dos osteoblastos que promove sua adesão no tecido ósseo (Reinholt et al., 1990; Dodds et al., 1995; McKee e Nanci, 1996).

Na remodelação óssea induzida, a OPN encontra-se aumentada devido ao processo dinâmico da remodelação óssea (Teraí et al., 1999; Fujihara et al., 2006; Chung et al., 2008). Assim, sua expressão é aumentada nos osteoblastos e osteócitos, além de apresentar papel relevante na diferenciação, proliferação e quimiotaxia de osteoclastos (Teraí et al., 1999). Em adição, pode ser encontrada em matriz do cimento, acumulando-se entre as fibrilas colágenas da junção cimento-dentinária, reforçando a união entre os tecidos ósseo e cementário (Bosshardt e Nanci, 1998).

Esta proteína, ainda, pode estar envolvida em diversos eventos biológicos incluindo processos inflamatórios, proliferação celular, invasão da matriz extracelular, progressão tumoral e metástase. Além disso, estão presentes no rim, cérebro, fluidos corporais (leite, saliva e sangue), tumores e placas ateroscleróticas (McKee e Nanci, 1996; Giachelli e Steiz, 2000; Sodek et al., 2000).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos da radiação laser Arseneto de Gálio Alumínio (AsGaAl), com comprimento de onda de 780nm e densidade de energia 20 J/cm², no periodonto de sustentação de ratos diabéticos, induzidos com solução de aloxano monoidratado e submetidos à movimentação ortodôntica com forças leves (20cN), mediante:

- a) mensuração linear da distância entre a junção amelo-cementária da face distal do 1º molar inferior e a junção amelo-cementária da face mesial do 2º molar inferior, do lado direito, utilizando radiografias digitais;
- b) análise descritiva das alterações dos tecidos periodontais envolvidos na movimentação ortodôntica;
- c) avaliação histomorfométrica do número de osteócitos imunorreativos ou não para osteopontina (OPN), expressando a intensidade de formação óssea, nas regiões entre os 1º e 2º molares inferiores e furca do 1º molar inferior do lado direito.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAS

4.1.1 Animais

Foram utilizados 60 ratos machos (*Rattus norvergicus*, *albinus*, *Wistar*), com 60 dias de idade, os quais foram divididos, aleatoriamente, em 4 grupos e avaliados após movimentação ortodôntica, nos períodos de 7, 14 e 21 dias, com 5 animais cada:

- ❖ **Controle (C)** - ratos normoglicêmicos submetidos à movimentação ortodôntica;
- ❖ **Laser (L)**- ratos normoglicêmicos submetidos à movimentação ortodôntica e radiação laser AsGaAl;
- ❖ **Diabetes (D)** – ratos diabéticos submetidos à movimentação ortodôntica;
- ❖ **Diabetes-Laser (D-L)** – ratos diabéticos submetidos a movimentação ortodôntica e radiação laser AsGaAl.

Os animais foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita

Filho”, campus de São José dos Campos – SP. Estes foram divididos em gaiolas, cada uma com 5 animais, e alimentados com dieta LABINA® (fabricante: GUABI- Guabinutrilabor para ratos e camundongos) e água “*ad libitum*”

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

4.1.2 Drogas, reagentes, compostos e soluções

Para a realização deste trabalho, utilizaram-se os seguintes compostos:

- Pré-anestésico cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3 tiazina (ROMPUN®, Bayer S.A., São Paulo, Brasil),
- Anestésico (Dopalen - Agribands do Brasil Indústria e Comércio Ltda., Paulínia, Brasil),
- Aloxano monoidratada (Sigma Aldrich Chemical - Saint Louis, MO, USA), solução fisiológica estéril (NaCl, 0.9%), hematoxilina e eosina (Merck, Darmstadt, Alemanha),
- EDTA (Sigma Aldrich Chemical - Saint Louis, MO, USA), paraformaldeído tamponado a 4% (Sigma Aldrich Chemical - Saint Louis, MO, USA),

- Álcool: absoluto, 90%, 80%, 70% (Merck, Darmstadt, Alemanha),
- Água destilada,
- H₂O₂ (Merck, Darmstadt, Alemanha), Tris (Merck, Darmstadt, Alemanha),
- BSA 1% (*Bovine Serum Albumin*) (Dako – Califórnia , USA),
- LSAB+Sys (Dako – Califórnia , USA), hematoxilina de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha),
- Tampão Tris 0,1M (pH7,6),
- DAB (código: K-3468, 3,3' Diaminobenzidina, Dako Cytomation Norden A/S, Núcleo Trade Cooperation, Dinamarca),
- Resina sintética (Entellan®, Merck - Darmstadt, Alemanha), ração granulada (Probiotério Moinho Primor S.A.),
- OPN- Osteopontina - mouse monoclonal 21742 (Santa Cruz Biological).

4.1.3. Materiais utilizados para mensuração da glicemia

Para a mensuração da glicemia, utilizamos monitor para glicemia e tiras teste (One Touch, Johnson & Johnson Company, California, USA).

4.1.3. Materiais utilizados para os procedimentos ortodônticos

Para a realização dos procedimentos ortodônticos, utilizamos os seguintes materiais :

- Molas fechadas de níquel titânio (Morelli® Campinas –São Paulo Brasil,
- Fio de amarrilho 0.30”; (Morelli® Campinas –São Paulo Brasil,
- Abridores de boca adaptado, confeccionados manualmente com fio de aço inoxidável de 0,8 mm de diâmetro; (Morelli® Campinas –São Paulo Brasil,
- Tensiômetro (Rock Mountain Orthodontics® Denver – USA),
- Espátula para manipulação de resina (HuFried);
- Ácido ortofosfórico a 37% (Quick cure - Reliance Orthodontic Products® Itaska USA),
- Adesivo dentário (Assure – (Quick cure - Reliance Orthodontic Products® Itaska USA),
- Resina composta fotopolimerizável (Quick cure - Reliance Orthodontic Products® Itaska USA).

4.1.4. Aparelho de laser de baixa potência e fotopolimerizador

Nesta pesquisa, o aparelho de laser de baixa potência e fotopolimerizador utilizado foi Twin Flex II Arcada - Mm Optics, exibido as seguintes características: emissores de Luz Laser e Laser de diodo LED, emissão contínua, potência óptica do laser de 40 a 150 mW (vermelho) e de 70-250 mW (laser infravermelho), angulação da caneta do laser de 50° e área do feixe de saída do laser de 4,0 mm².

4.2. Métodos

4.2.1 Preparação dos animais para indução do Diabetes mellitus

A indução do diabetes foi realizada sete dias antes dos procedimentos ortodônticos. O fármaco diabetogênico utilizado foi o aloxano monoidratado (Sigma Aldrich Chemical - Saint Louis, MO, USA). Os animais permaneceram em jejum a partir das 17 horas do dia anterior e após o procedimento de indução do diabetes, recebendo apenas água.

A solução de aloxano monoidratado foi preparada na concentração de 8 mg/mL de solução fisiológica estéril (NaCl, 0.9%). Os animais foram pesados previamente e a referida droga foi administrada por via veia peniana, na dose de 40 mg/Kg (0,5 mL/100g de peso)- (Figura1)

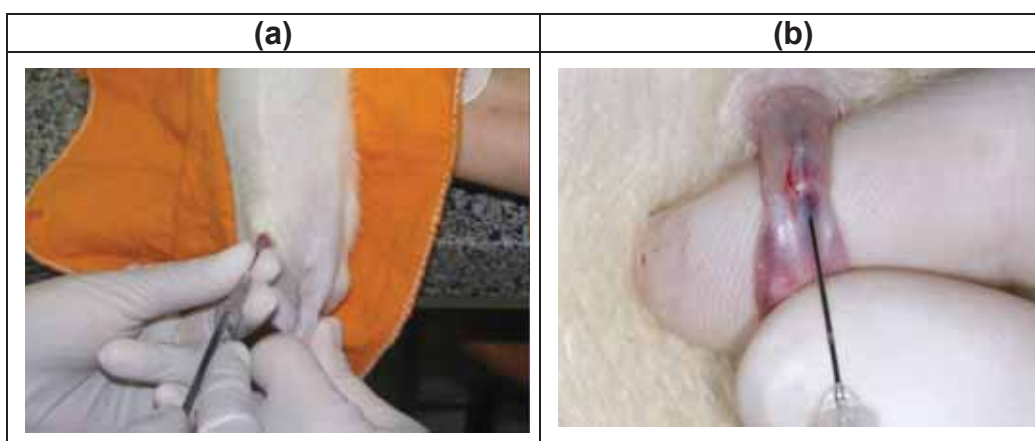


Figura 1 – Técnica da administração do aloxano monoidratado na veia peniana (a e b).

4.2.2 Mensuração da glicemia

Para mensuração da glicemia dos animais, utilizamos amostras de sangue da veia caudal dos animais e os valores da concentração de glicose no sangue (mg/dL) foram mensurados com o auxílio do monitor para glicemia e tiras teste. A glicemia foi mensurada, em nível basal, 24 horas antes da administração do fármaco diabetogênico, 72 horas após a indução e alguns minutos antes do sacrifício dos animais (Figura 2).

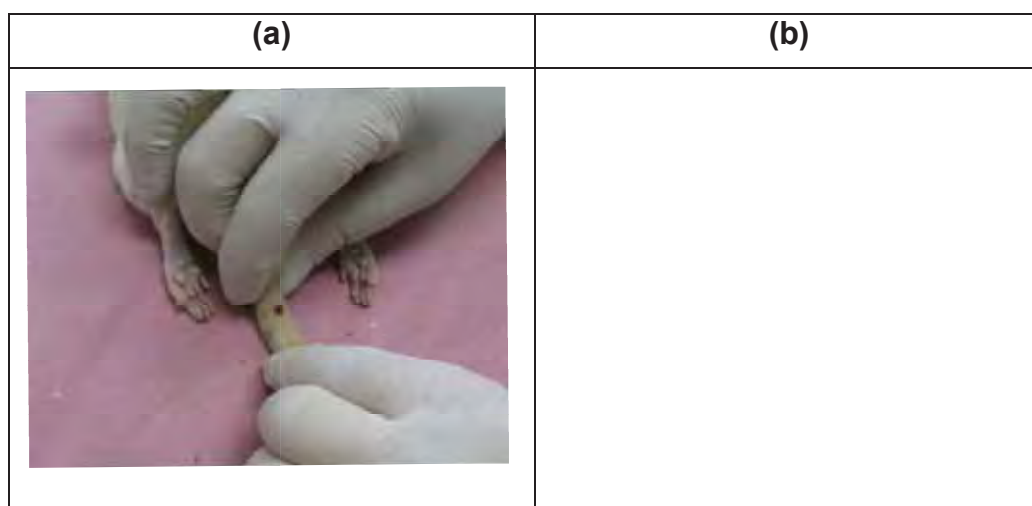


Figura 2 - Monitoramento da glicemia do animal.

4.2.3 Procedimentos para movimentação ortodôntica

Após sete dias da indução do diabetes e comprovada sua estabilização, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (5 mg/Kg), associado a xilazina (10 mg/kg), administrado por via intramuscular (IM).

Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito dorsal numa mesa cirúrgica adaptável. Com auxílio de 2 abridores de boca confeccionados manualmente, instalou-se uma mola de Niti (Níquel Titânio). Esta mola interligava o 1º molar inferior e incisivo inferior do lado direito, sendo fixada neste último com resina composta fotoativada. Além

disso, exercia uma força de 20 cN, a qual foi mensurada com um tensiômetro de precisão (Figura 3).

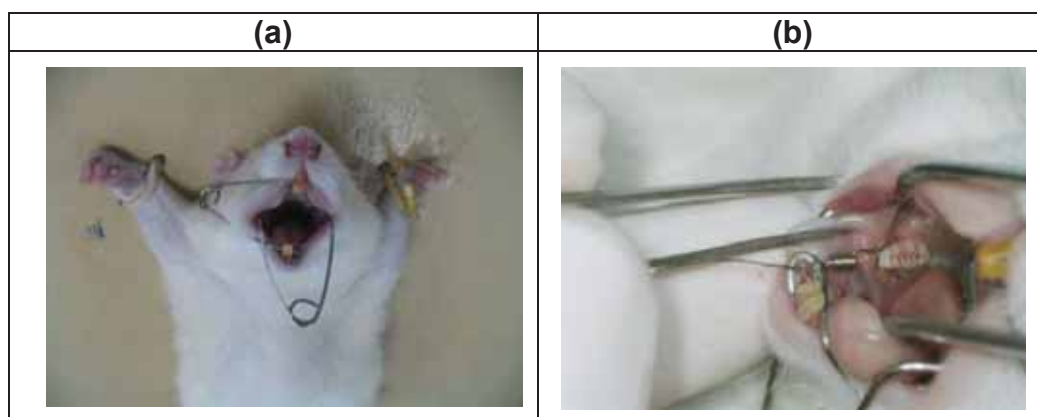


Figura 3 - Posicionamento de abridores de boca confeccionados com fio e aço inoxidável de 0,8 de diâmetro (a) e instalação de mola de Niti no 1º molar inferior e incisivo inferior do lado direito (b), exercendo uma força de 20 cN

4.2.4 Aplicação da radiação laser Arseneto de Gálio Alumínio (AsGaAl)

Os animais dos grupos Laser e Diabetes+Laser foram submetidos à radiação laser AsGaAl, com comprimento de onda de 780 nm, densidade de energia de 20 J/cm², tempo de exposição de 40 segundos e potência de 120 mW. A emissão da luz laser foi aplicada num único ponto e de modo contínuo na região vestibular entre 1º e 2º molares inferiores direito, na transição dos terços cervical e médio, em dias alternados até o sacrifício dos animais.

4.2.5 Período de observação e preparação dos espécimes

Decorridos 7, 14 e 21 dias da instalação dos dispositivos ortodônticos, todos os ratos foram anestesiados e, em seguida, sacrificados por decapitação. Imediatamente após, as hemimandíbulas do lado direito foram retiradas, fixadas em paraformaldeído tamponado a 4% por 48 horas, radiografadas e descalcificadas em EDTA, processadas e incluídas em parafina.

Os cortes histológicos foram realizados no sentido longitudinal da hemimandíbula, com aproximadamente 3 μ m de espessura, sendo obtidas 10 lâminas histológicas para cada animal. Essas lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H.E.) para a análise histomorfológica e imunomarcadas para o anticorpo Osteopontina (OPN) para auxiliar na avaliação histomométrica.

4.2.6 Análise Radiográfica

As imagem radiográficas foram obtidas por meio do aparelho de raios X Gendex 765 DC, regulado para 65 KVp e 7mA. As hemimandíbulas foram posicionadas sobre o sensor CCD (*Charge*

Coupled Device) paralelamente ao solo, com área ativa de 20 mm de largura por 30 mm de comprimento. O feixe central de raios-X foi direcionado, perpendicularmente, a esse sensor, com a distância foco-objeto de 40 cm e em tempo de exposição de 0,04 segundos.

Utilizou-se o programa Visualix 2.0 para obtenção das imagens digitais da hemimandíbula e foram armazenadas em arquivo de formato JPEG. Em seguida, realizou-se a mensuração linear da distância entre a junção amelo-cementária da face distal do 1º molar inferior e a junção amelo-cementária da face mesial do 2º molar inferior, do lado direito, com o auxílio do programa Photoshop 3.0.

Este programa permitiu o aumento da imagem original em 200 vezes, utilizando-se a ferramenta “régua” do sistema. Posteriormente, a mensuração foi obtida pelos valores de “W” (largura), “A” (angulação) e “H” (altura). Para a fidelidade das medidas lineares, a linha horizontal obtida deve apresentar o valor zero para os parâmetros de “A” e “H”.

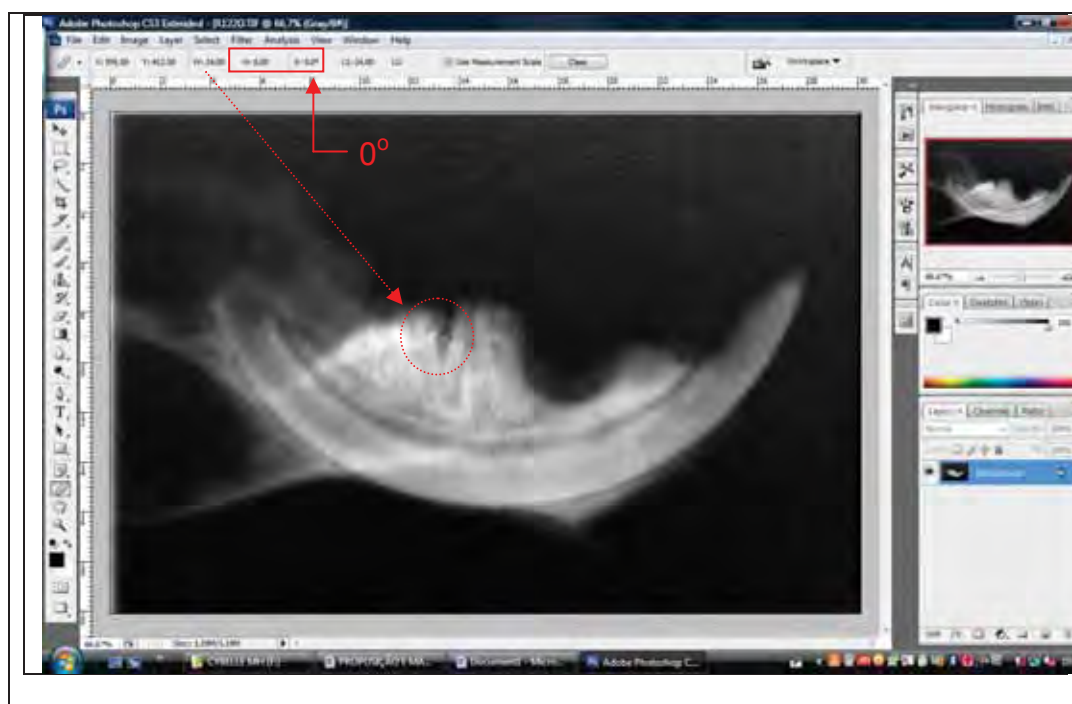


Figura 4 – Ilustração exibindo o procedimento de mensuração das medidas lineares das distâncias entre a junção amelo-cementária da face

distal do 1º molar inferior e a junção amelo-cementária da face mesial do 2º molar inferior, utilizando a ferramenta “régua” do programa Photoshop 3.0.

4.2.7 Análise Histomorfológica

Nesta análise, descrevemos as alterações estruturais evidenciadas no periodonto durante a movimentação dentária, tais como: tipos de células inflamatórias, intensidade do processo inflamatório, aspectos do ligamento periodontal, alterações regressivas dos dentes e de formação e/ou reabsorção do tecido ósseo alveolar nas regiões entre os 1º e 2º molares inferiores e furca do 1º molar inferior do lado direito.

4.2.8 Análise Imunohistoquímica

Para a imunohistoquímica, propriamente dita, utilizou-se o método indireto com sistema de amplificação (Peroxidase, Biotina e Estreptavidina), que é extremamente sensível, podendo ser utilizadas concentrações muito baixas do anticorpo primário.

Previamente, os cortes histológicos foram desparafinizados em placa aquecedora por 30 minutos, à 60°C, lavados em xilol por 20 minutos e hidratadas em álcool absoluto, 90°, 80°, 70° e

em água destilada, por 5 minutos cada. Ressalva-se que esses procedimentos foram realizados em cabine de segurança biológica (modelo BioSAFE -09/Classe II/tipo B2, marca Vecoflow, Campinas, SP). Imediatamente após, realizou-se a recuperação antigênica com o auxílio do forno microondas (marca Panasonic, modelo Inverter), em dois ciclos de 3 minutos, com nível potência de 5.

Todas as fases, a seguir, foram realizadas em bandeja de incubação específica para técnica de imunohistoquímica (marca Erviegas, São Paulo, SP). Posteriormente, os cortes histológicos foram lavados com tampão Tris e tratados em H₂O₂ (30%) por 30 minutos, objetivando inativar a peroxidase endógena do tecido. Em seguida, ocorreu a incubação dos cortes em BSA 1% por 30 minutos.

As lâminas histológicas foram incubadas no anticorpo primários “anti-rato” Osteopontina (AKm2A1, código: SC-21741, Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA), por 2 horas.

Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas com tampão Tris 0,1M (pH7,6) por 5 minutos e os cortes histológicos foram incubados no anticorpo secundário, LSAB+Sys-HRP (Código: K0690, Dako Cytomatiom Norden A/S, Núcleo Trade Corporation, Dinamarca). O procedimento sequencial para a utilização do anticorpo secundário está descrito da seguinte forma: 1ª incubação com anticorpo biotinilado por 10 minutos à temperatura ambiente, 2ª lavagem com tampão Tris pH 7,6, 3ª incubação com anticorpo conjugado com estreptavidina e peroxidase por 10 minutos à temperatura ambiente e 4ª lavagem com tampão Tris pH 7,6.

As lâminas silanizadas foram reveladas em líquido de DAB (código: K-3468, 3,3' Diaminobenzidina, Dako Cytomatiom Norden A/S, Núcleo Trade Corporation, Dinamarca), por 1 minuto. A contra coloração foi obtida com a utilização de hematoxilina de Mayer por 20 segundos. Essas lâminas foram, novamente, desidratadas na seguinte sequência: água destilada, álcool 70°, 80°, 90°, álcool absoluto e xilol. Em

seguida, as lâminas e lamínulas histológicas foram montadas com o auxílio de resina sintética (Entellan®, Merck) para análise.

Para avaliar a fidelidade da metodologia empregada na análise imunohistoquímica, os controles negativos foram obtidos dos cortes histológicos dos respectivos grupos estudados sem a presença do anticorpo primário OPN.

4.2.9 Avaliação Histomorfométrica

Para a realização da análise histomorfométrica, foi utilizado o método “estereológico” ou “casualização de amostra” que consiste em determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes histológicos, com intuito de eliminar a ocorrência de vício na amostragem. O referido método baseia-se no princípio geométrico-estatístico, derivados da probabilidade das imagens e dos perfis da estrutura na secção histológica, resultando num sistema-teste efetivo. Portanto, realizaram-se os procedimentos de escolhas aleatórias para as seguintes fases do experimento: seleção dos animais, dos blocos histológicos, das lâminas histológicas e dos cortes e campos histológicos.

Para este estudo, utilizou-se o programa Axiovision 4.7 (Carl Zeiss Vision Imaging Systems, Carl Zeiss, Alemanha), responsável pela elaboração de um sistema teste específico de histomorfometria. Os cortes histológicos foram analisados com auxílio da objetiva 63x (A-Plan, Carl Zeiss), em imersão, e ocular 10x (W-PI, Carl Zeiss) de um microscópio de luz (Axioskop 40, Carl Zeiss, Alemanha). As imagens foram captadas por uma câmera digital (AxioCam MRc5, Carl Zeiss, Alemanha).

Para realizar a histomorfometria da imunohistoquímica, foi mensurado o número de células imunorreativas para osteopontina (OPN), em 5 campos histológicos nas regiões dos terços cervical, médio e apical da PAREDE ALVEOLAR DISTAL e FURCA do 1º molar inferior, em 3 cortes por lâmina.

4.2.10 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada a partir dos resultados obtidos da mensuração linear da distancia entre a junção amelo-cementária da face distal do 1º. molar inferior e a junção amelo-cementária da face mesial de 2º. molar direitos e da contagem de osteócitos imunorreativos ou não para o anticorpo primário OPN, 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 RADIOGRÁFICA

Analisando os dados da tabela 1 e 2, na movimentação ortodôntica (MO), aos 7 dias o grupo laser obteve distância linear, estatisticamente significativa, maior que o grupo controle. Os demais grupos não obtiveram diferenças significativas, neste mesmo período. Dentre os grupos, aos 14 dias, não houve diferença estatística, mantendo valores de distancia linear semelhantes.

Aos 21 dias, os animais diabéticos apresentaram distância de MO significativamente maior do que os animais normoglicêmicos, tanto animais irradiados quanto não irradiados. Os animais diabéticos radiados obtiveram distância linear estatisticamente significativa menor que os animais diabéticos, neste período. Os grupos controle e laser obtiveram médias de movimentação semelhantes, ou seja, sem diferença estatística aos 21 dias de observação.

Tabela 1 – Teste de Tukey da medida linear (pixel) entre a junção amelo-cementária da face distal do 1º molar inferior e a junção amelo-cementária

da face mesial do 2º molar inferior, do lado direito, após movimentação ortodôntica, em todos os grupos estudados. Nível de significância estatística (*P*).

GRUPOS	NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (<i>P</i>)		
	7 Dias	14 Dias	21 Dias
C x D	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P < 0.001$
C x L	$P < 0.001$	$P > 0.05$	$P > 0.05$
C x D-L	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P < 0.001$
D x L	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P < 0.001$
D x D-L	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P < 0.05$
L x D-L	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P < 0.001$

•C: Controle; L: Laser ; D: Diabetes; D-L: Diabetes -Laser.

O

Tabela 2 – Análise de variância (ANOVA), referentes à medida linear (pixel) entre a junção amelo-cementária da face distal do 1º molar inferior e a junção amelo-cementária da face mesial do 2º molar inferior, do lado direito, após movimentação ortodôntica, em todos os grupos estudados (n=5)

GRUPOS	MEDIDA LINEAR (pixel)		
	7 Dias	14 Dias	21 Dias
C	16,50 ± 0,63	19,42 ± 0,78	21,13 ± 1,19
L	22,28 ± 0,78	21,71 ± 0,64	24,56 ± 2,11
D	18,56 ± 1,42	21,42 ± 1,43	39,08 ± 2,00
D-L	19,70 ± 0,64	20,85 ± 1,28	35,47 ± 4,567

•C: Controle; L: Laser ; D: Diabetes; D-L: Diabetes -Laser.

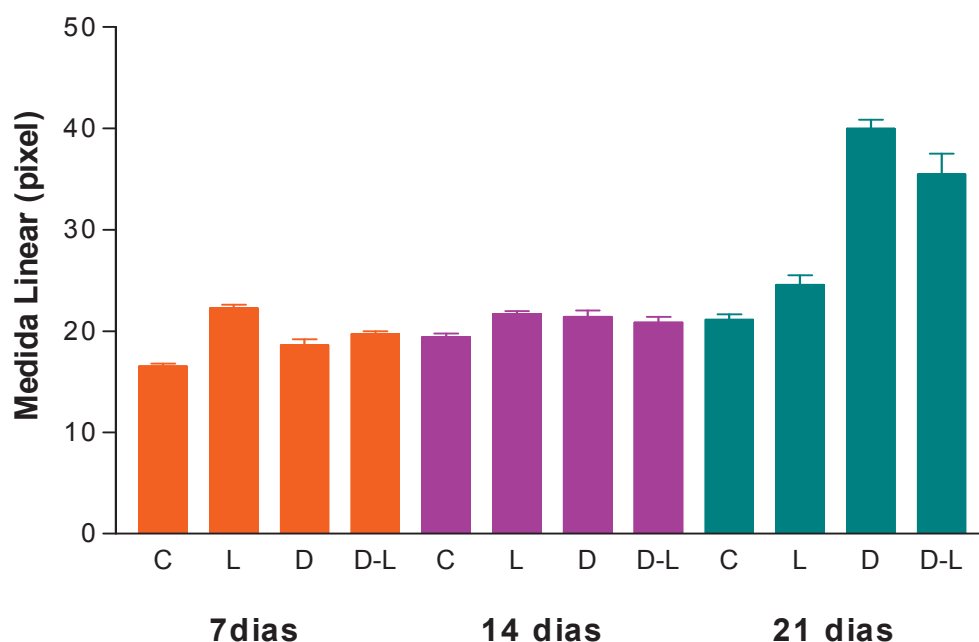


Figura 5 - Representação gráfica dos valores médios da medida linear entre a junção amelo-cementária da face distal do 1º molar inferior e a junção amelo-cementária da face mesial do 2º molar inferior, do lado direito, após movimentação ortodôntica, em todos os grupos estudados.

5.2 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

Os aspectos histomorfológicos foram analisados na região do 1º e 2º molares inferiores, sendo verificadas as alterações no periodonto de sustentação associadas ou não as alterações regressivas dos elementos dentários presentes na referida região, após 7, 14 e 21 dias de observação.

7 dias

No **grupo Controle**, observávamos discreta perda das paredes ósseas do periodonto de sustentação nas regiões interproximal do 1º e 2º molares inferiores e formação de tecido ósseo na região de furca do 1º molar inferior, exibindo predominância de trabéculas ósseas espessas e maduras. O ligamento periodontal apresentava espessamento contínuo em todo o contorno do dente envolvido na movimentação ortodôntica. Esta estrutura era constituída por tecido conjuntivo frouxo, bem celularizado e vascularizado, com infiltrado de raras células inflamatórias mononucleares. Na região interproximal, a gengiva estava revestida por epitélio estratificado não queratinizado com poucas camadas. Nas adjacências, a lâmina própria era composta por tecido conjuntivo frouxo, exibindo discreto infiltrado de células inflamatórias mononucleares e vasos sanguíneos de pequeno calibre. Na região do espaço biológico, notávamos-se tecido conjuntivo bem celularizado e desorganização das fibras colágenas.. Em adição, hipercementoses estavam presentes e limitadas na porção apical das raízes envolvidas na movimentação (Figura 6).

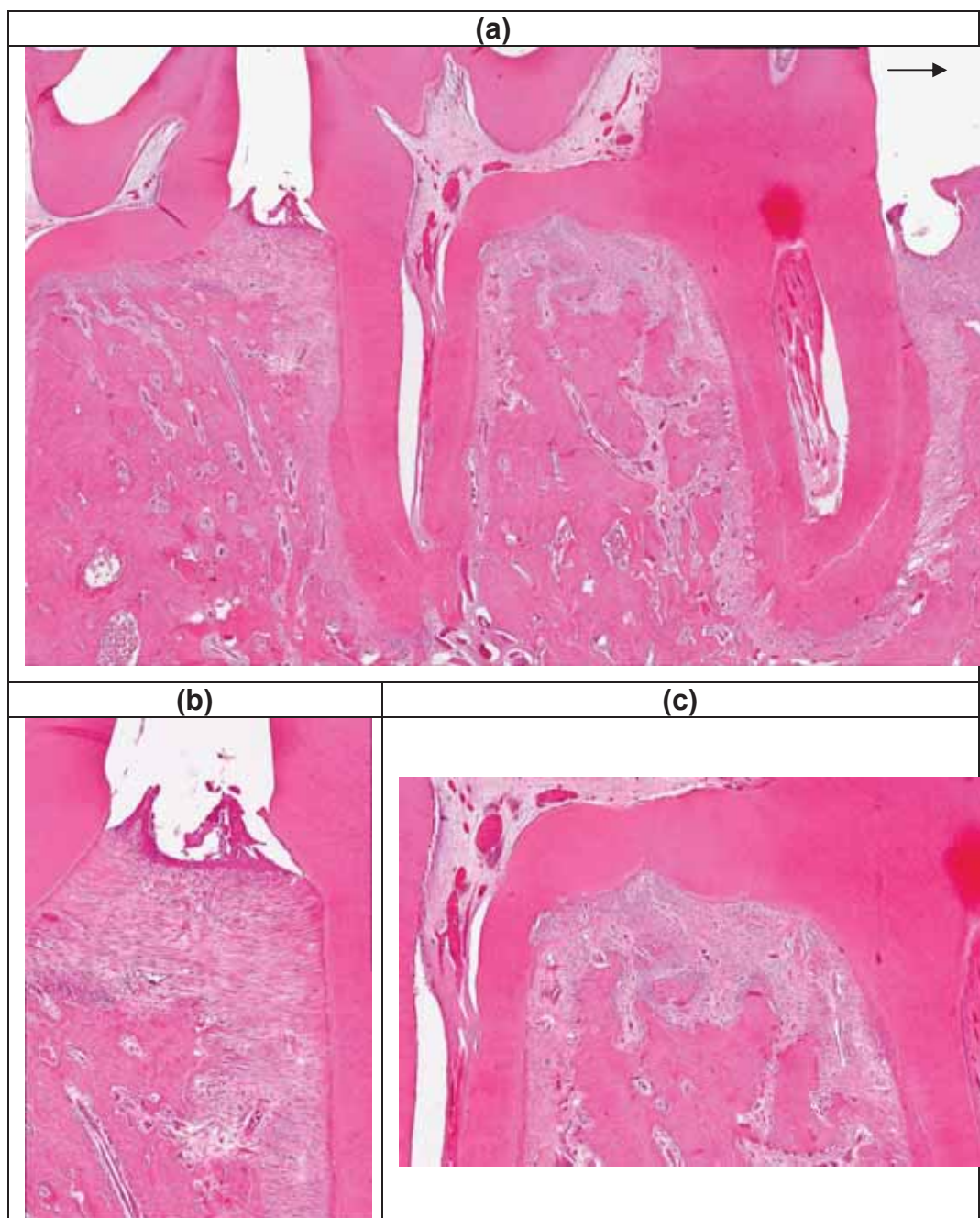


Figura 6 – **Controle. 7 dias.** Fotomicrografia mostrando região do 1º molar inferior movimentado (a) exibindo papila interproximal entre os 1º e 2º molares inferiores (b) e furca do 1º molar inferior com aspecto normal. Aumento original: 100x; H.E.

No **grupo Laser**, os espécimes exibiam papila interproximal gengiva livre Interproximal, entre o 1º e 2º molares inferiores, revestida por epitélio estratificado não queratinizado, exibindo poucas camadas de células, espongirose, discretas exocitose e projeções de cristas epiteliais interligando-se entre si. A lâmina própria era composta por tecido conjuntivo frouxo, 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 na região interproximal dos 1º e 2º molares inferiores, sendo composto por tecido conjuntivo frouxo e fibras colágenas com arranjo desorganizado. O ligamento periodontal apresentava espessamento contínuo em todo o contorno do dente envolvido na movimentação ortodôntica. Esta estrutura era constituída por tecido conjunto frouxo, bem celularizado e vascularizado, com infiltrado de raras células inflamatórias mononucleares. Notava-se que houve formação contínua de formação de tecido ósseo nas regiões interproximal do 1º e 2º molares inferiores e de furca do 1º molar inferiores, sem que houvesse quaisquer prejuízos na histomorfologia do periodonto de sustentação, durante o período de 21 dias de movimentação ortodôntica (Figura 7).

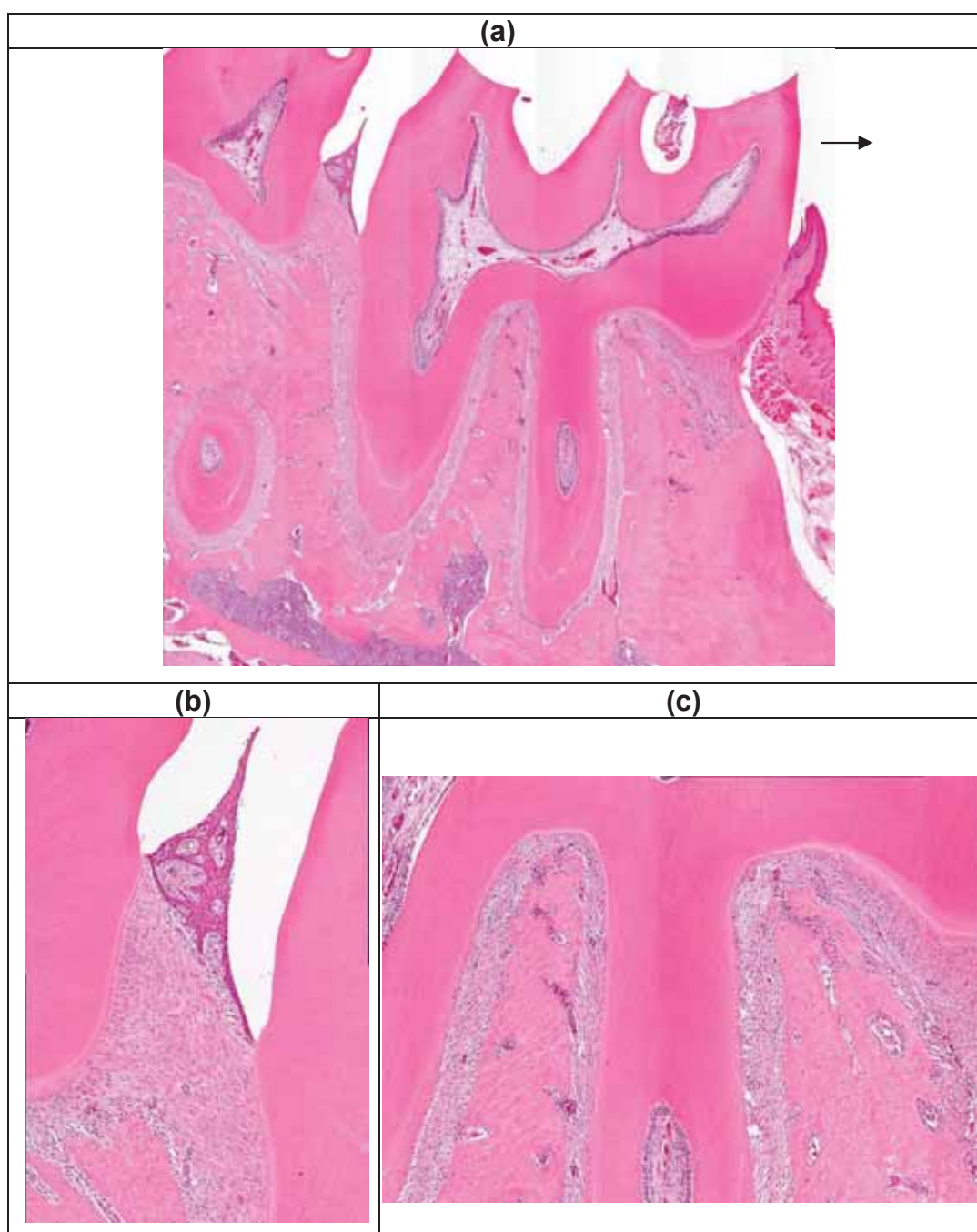


Figura 7 – **Laser. 7 dias.** Fotomicrografia mostrando região do 1º molar inferior movimentado (a) exibindo papila interproximal entre os 1º e 2º molares inferiores (b) e furca do 1º molar inferior com aspecto normal. Aumento original: 100x; H.E.

No **grupo Diabetes**, os espécimes mostravam variação na quantidade de perda óssea na região dos 1º e 2º molares inferiores e furca do 1º molar inferior. Em discrepantes perdas ósseas, notavam-se regiões com intensa atividade osteoclásticas associada às extensas áreas de tecido de granulação, além da substituição do tecido ósseo alveolar por tecido conjuntivo frouxo, ricamente celularizado e com numerosos vasos sanguíneos de calibres variados. Em adição, havia intenso e difuso infiltrado de células inflamatórias, predominantemente, mononucleares no periodonto de sustentação, submetido aos efeitos da movimentação ortodôntica e laserterapia. A gengiva livre encontrava-se revestida por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, com presença de moderada exocitose, além da presença de biofilme nas faces livres distal do 1º molar e mesial do 2º molar. Outros espécimes mostravam discreta perda óssea da parede alveolar entre 1º e 2º molares e da região de furca do dente envolvido na movimentação ortodôntica. Ressalva-se, portanto, que a preservação da furca estava diretamente relacionada à integridade da parede alveolar da região interproximal, em questão (Figuras 8).

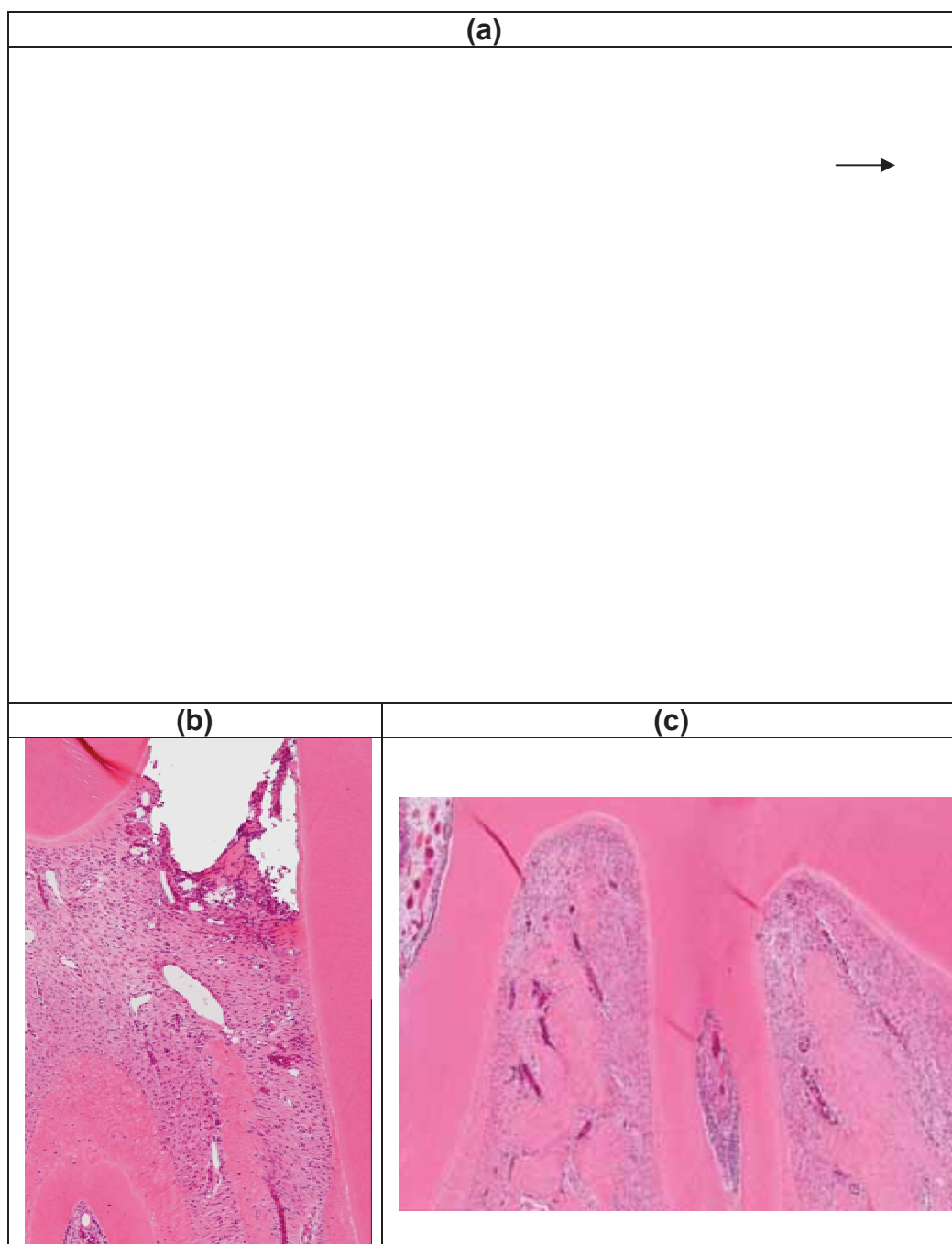


Figura 8 – **Diabetes. 7 dias.** Fotomicrografia mostrando região do 1º molar inferior movimentado (a) exibindo papila interproximal entre os 1º e 2º molares inferiores (b) e furca do 1º molar inferior com aspecto normal.

No **grupo Diabetes-Laser**, os espécimes mostravam de discreta a moderada destruição óssea da parede alveolar entre os 1º e 2º molares inferiores e da região de furca do 1º molar inferior. Intensa atividade osteoclástica está evidenciada, principalmente, em áreas com presença de tecido de granulação e, conseqüentemente, devido às perdas teciduais do periodonto de sustentação. Todavia, verificava-se que alguns espécimes exibiam preservação da região de furca do 1º molar inferior e do espaço biológico. 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 9 e 10).

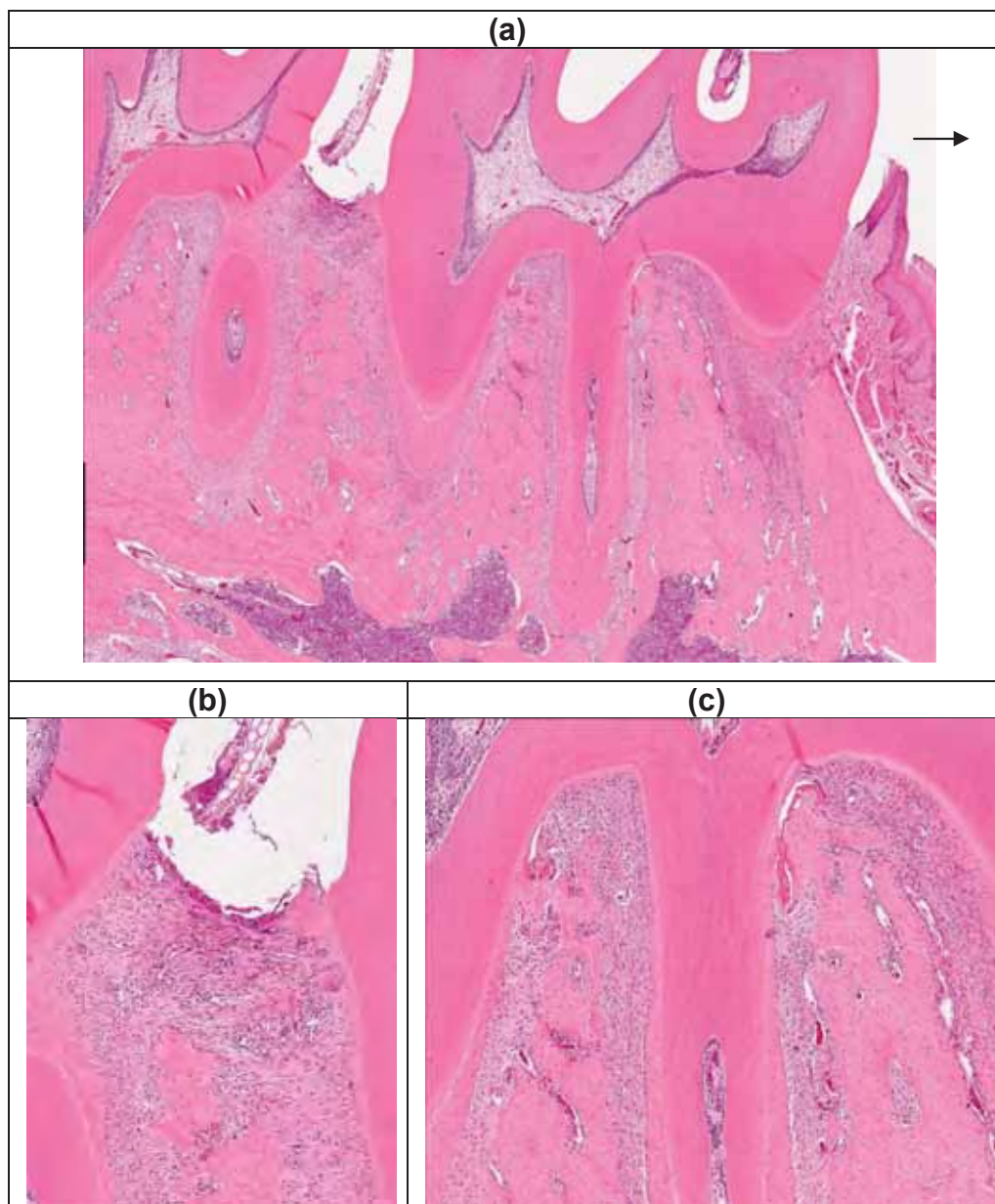


Figura 9 – **Diabetes-Laser. 7 dias** Fotomicrografia mostrando região do 1º molar inferior movimentado (a) exibindo papila interproximal entre os 1º e 2º molares inferiores (b) e furca do 1º molar inferior com aspecto normal. Aumento original: 100x; H.E.

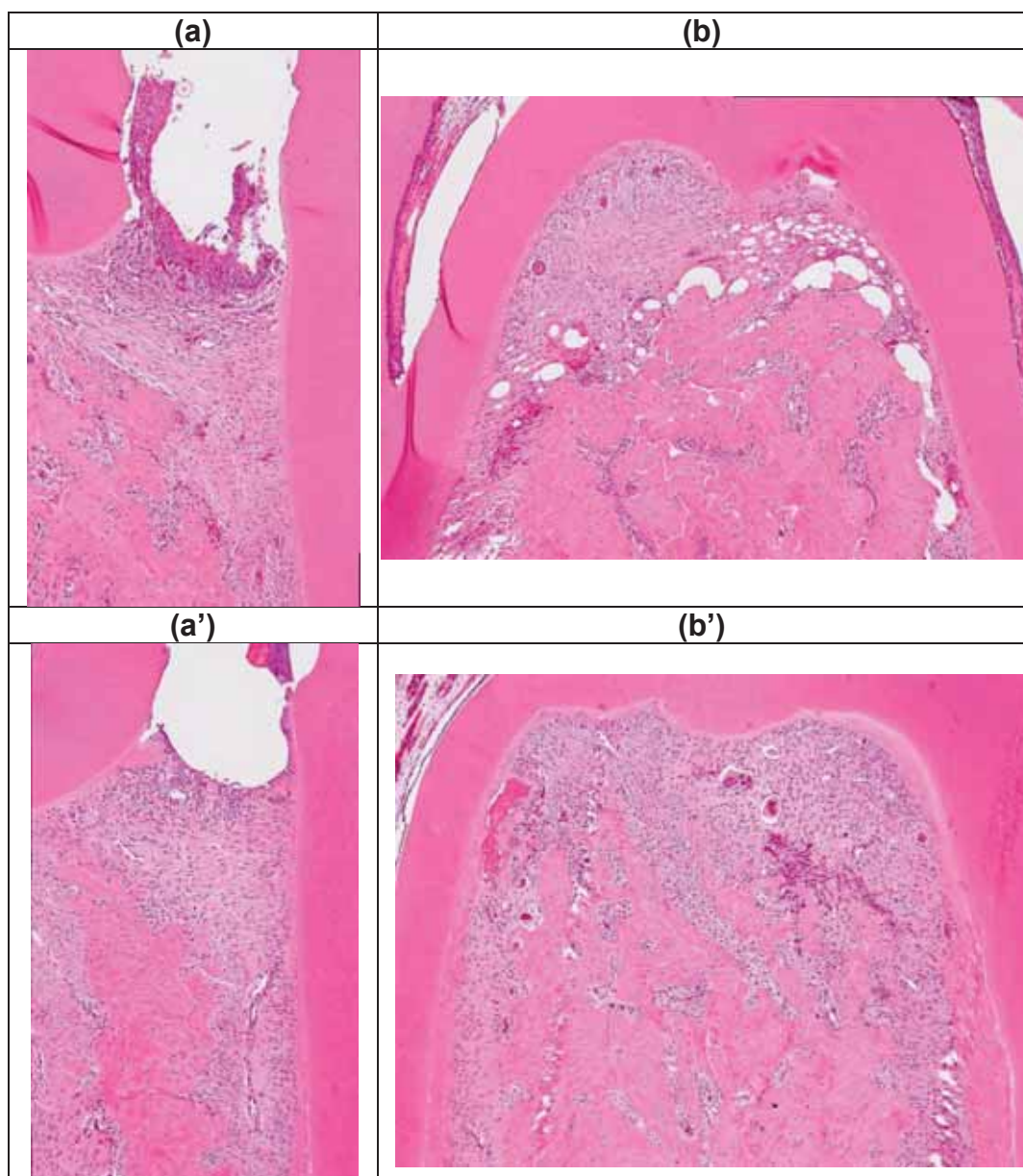


Figura 10 – **Diabetes-Laser. 7 dias**. Diferentes aspectos histológicos das regiões interproximal, entre os 1º e 2º molares inferiores (a e a') e de furca (b e b') em alguns ratos diabéticos tratados com radiação laser. Aumento original: 100x; H.E.

14 dias

Nos grupos **Controle**, observávamos que, alguns espécimes exibiam paredes ósseas do periodonto de sustentação do 1º molar inferior reabsorvidas devido à atividade osteoclástica, desenvolvendo bolsas periodontais de tamanhos variados e tipos vertical e horizontal. Na região interproximal, entre o 1º e 2º molares inferiores, a gengiva mostrava-se revestida por pseudomembrana serofibrinosa, sendo apoiada sobre tecido de granulação, 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 era constituída, predominantemente, por tecido conjuntivo frouxo com intenso infiltrado de células inflamatórias e numerosos vasos sanguíneos. Todavia, notava-se que alguns fragmentos exibiam tecido de granulação, principalmente, em regiões com comprometimento de furca do 1º molar inferior, além de evidentes reabsorções radiculares externas. Neoformação de tecido ósseo na região de furca do 1º molar eram observados na maioria dos animais, exibindo trabéculas ósseas delicadas e irregulares. As fibras colágenas do ligamento periodontal da região interproximal dos 1º e 2º molares foram destruídas, permanecendo as fibras oblíquas e periapicais. Em adição, hipercementoses estavam presentes e limitadas na porção apical das raízes envolvidas na movimentação. reabsorções radiculares, principalmente,, nos 1º molar inferior movimentado e colonização microbiana na superfície dos tecidos gengivais completavam o quadro histológico (Figura 11).

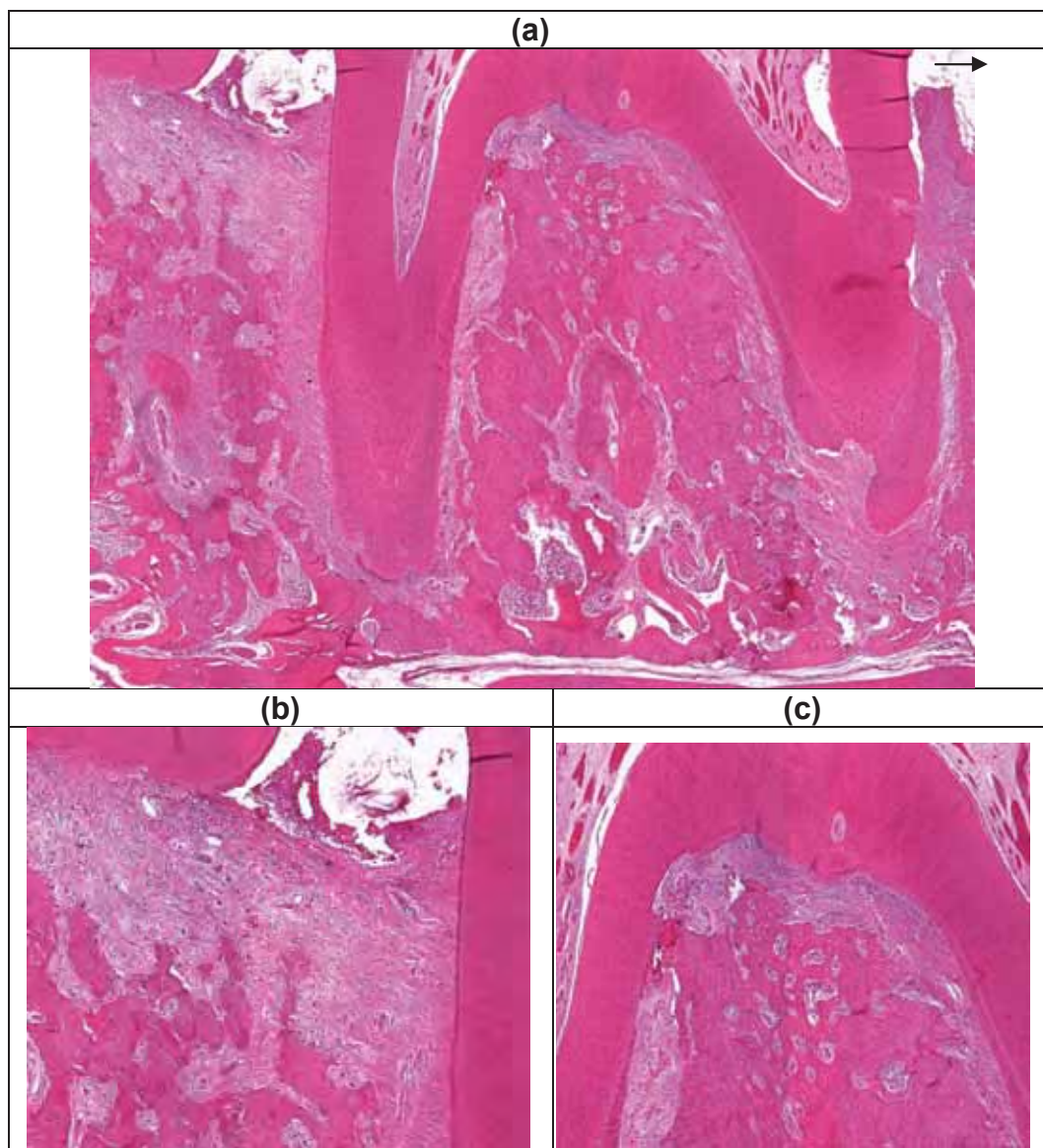


Figura 11 – **Controle. 14 dias.** Fotomicrografia da região do 1º molar inferior (a) exibindo severa periodontite crônica na região interproximal (b) e intenso infiltrado de células inflamatórias mononucleares na região de furca do dente envolvido na movimentação ortodôntica (c). Aumento original: 100x; H.E.

No grupo **Laser**, a papila interproximal, entre os 1º e 2º molares inferiores, apresentavam revestidas por epitélio pavimentoso estratificado, e exibiam discreto infiltrado de células inflamatórias mononucleares, localizado predominantemente na região subepitelial. As fibras do ligamento periodontal e região de furca, envolvendo o 1º molar inferior, apresentavam-se preservadas e com aspecto de normalidade, respectivamente. Hipercementoses e ausência de reabsorções radiculares do 1º molar inferior eram evidenciadas (Figura 12).

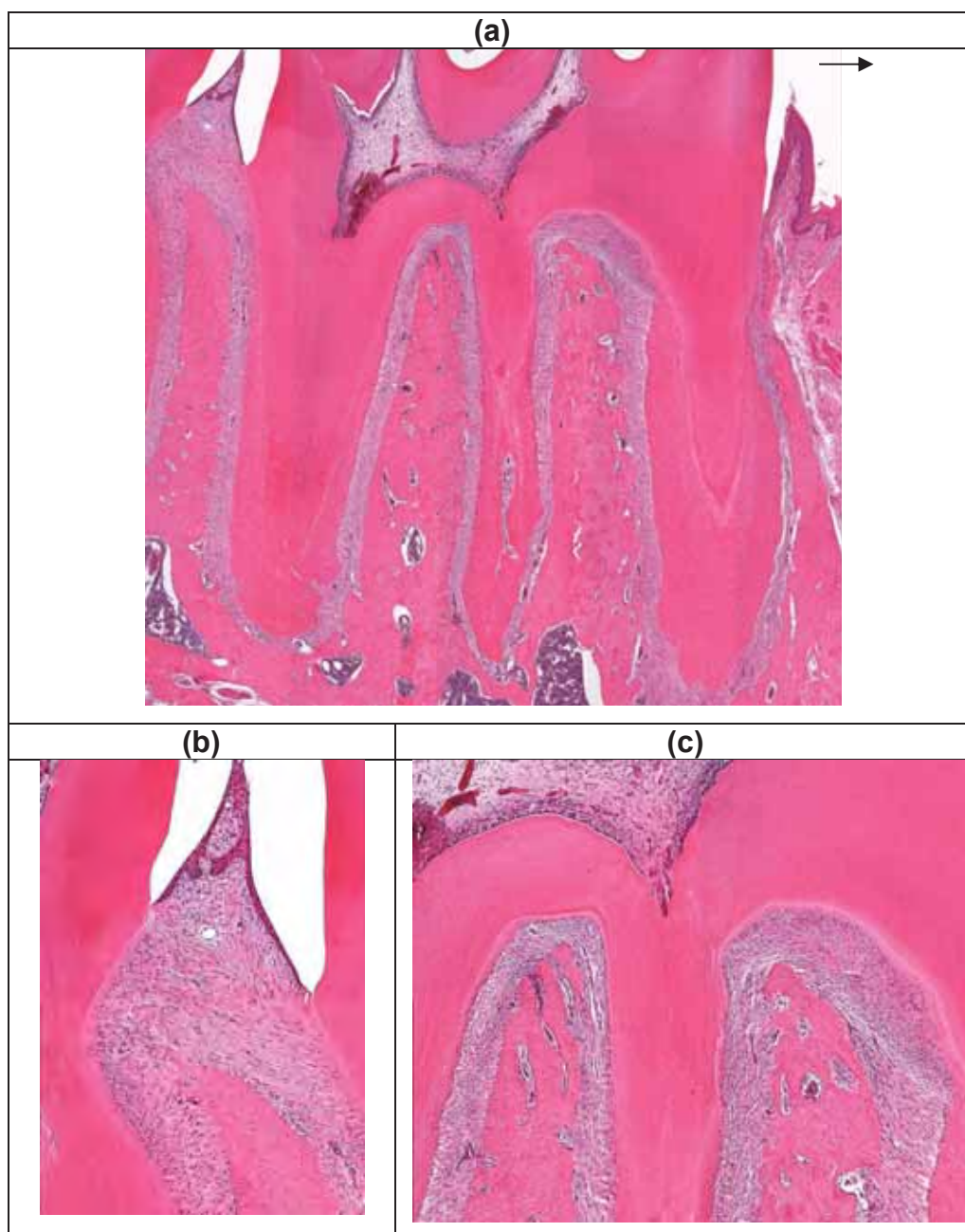


Figura 12 – **Laser. 14 dias.** Fotomicrografia exibindo região do 1º molar inferior (a) mostrando papila interproximal entre os 1º e 2º molares inferiores (b) e furca do 1º molar inferior com aspecto normal. Aumento original: 100x; H.E.

No **grupo Diabetes**, a maioria dos espécimes exibia perda das paredes ósseas do periodonto de sustentação da região do 1º e 2º molares inferiores, devido à intensa atividade osteoclástica, além de proliferação e invaginação de epitélio juncional na região de furca do 1º molar inferior. Neste aspecto histomorfológico, a gengiva livre mostrava-se revestida por epitélio pavimentoso estratificado com presença de acantose e exocitose, enquanto que a lâmina própria era constituída por tecido conjuntivo frouxo, ricamente celularizada e vascularizada, exibindo difuso infiltrado de células inflamatórias, predominantemente, mononucleares. É notório a acentuada destruição de tecido ósseo na região de furca, todavia, em alguns cortes histológicos, observava-se presença de delicadas trabéculas ósseas imaturas na referida região. Extensas hipercementoses e necrose do tecido pulpar estavam presentes no elemento dentários envolvido na movimentação. Em adição, numerosas reabsorções radiculares, principalmente,, nos 1º molar inferior movimentado e colonização microbiana na superfície dos tecidos gengivais completavam o quadro histológico (Figuras 13 e 14).

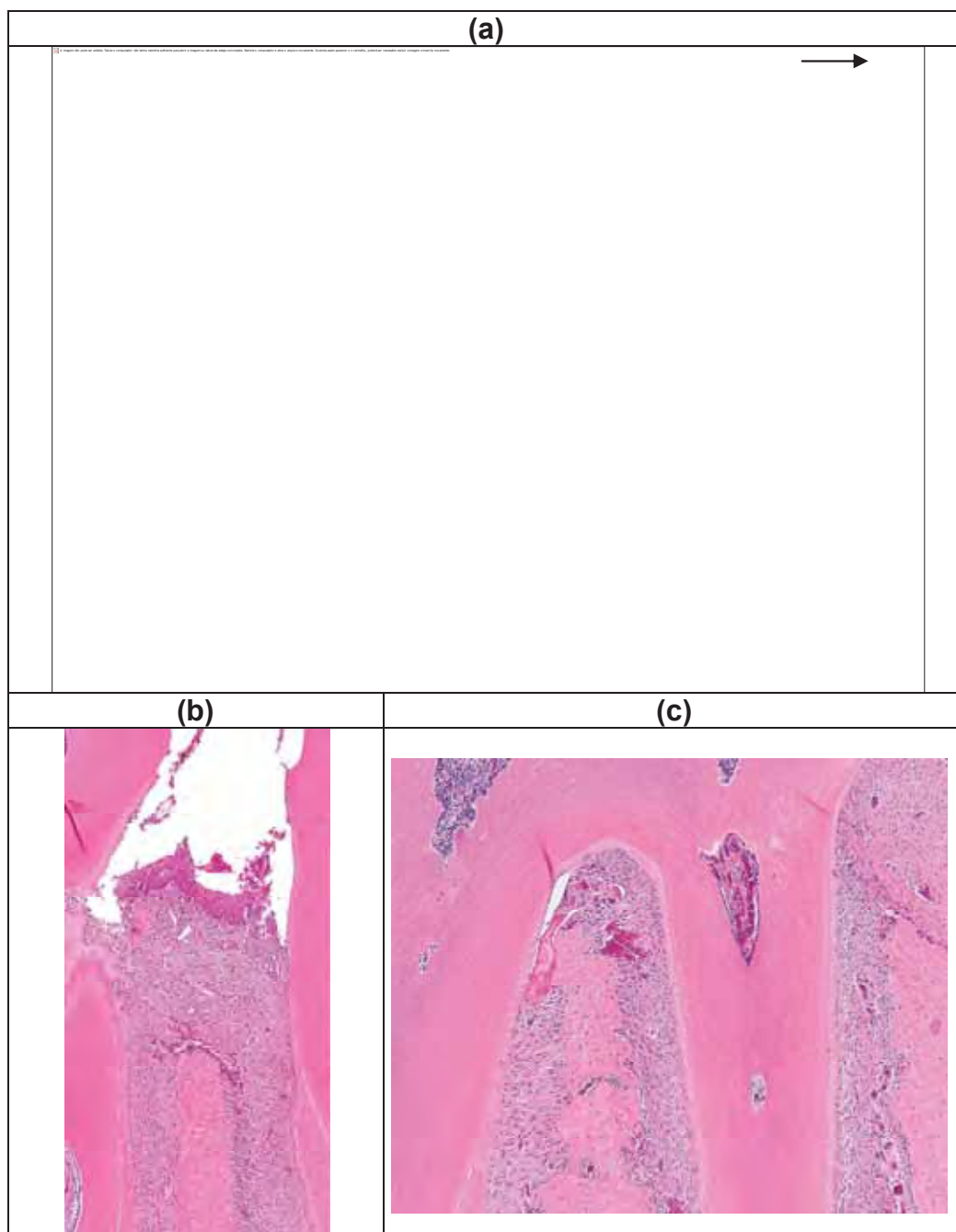


Figura 13 – **Diabetes. 14 dias.** Fotomicrografia exibindo região do 1º molar inferior (a) mostrando papila interproximal entre os 1º e 2º molares inferiores (b) e furca do 1º molar inferior com aspecto normal. Aumento original: 100x; H.E.

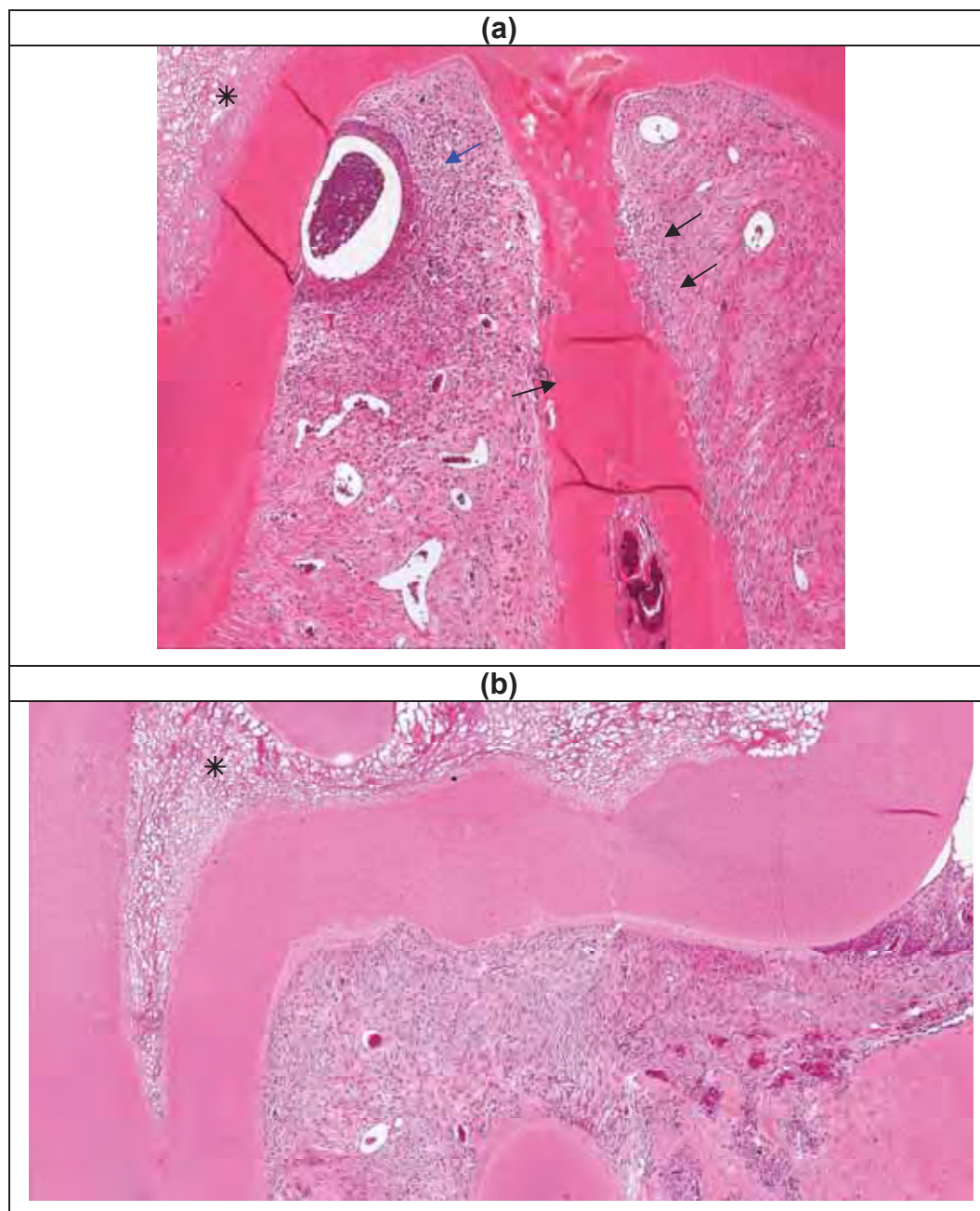


Figura 14 – **Diabetes. 14 dias.** Fotomicrografia exibindo necrose do tecido pulpar (asterisco), reabsorção radicular (*setas pretas*), reabsorção do tecido ósseo e invaginação do epitélio juncional (*seta azul*) para a região de furca do elemento dentário movimentado (a e b). Aumento original: 100x; H.E.

No grupo **Diabetes-Laser**, os espécimes exibiam periodontite crônica nas regiões interproximais, entre os 1º e 2º molares inferiores e mesial do 1º molar inferior movimentado. O epitélio era pavimentoso estratificado queratinizado parcialmente queratinizado, com acantose, degeneração hidrópica e intensa exocitose. A lâmina própria, constituída por tecido conjuntivo, mostrava moderado infiltrado inflamatório de células inflamatórias. O tecido conjuntivo do ligamento periodontal, principalmente na região cervical e apical do elemento dentário movimentado, revelava números vasos sanguíneos de tamanho pequeno a médio e dilatados em alguns espécimes. Áreas de tecido de granulação na região de furca do 1º molar eram, também, evidenciadas em alguns animais diabéticos (Figuras 15 e 16).

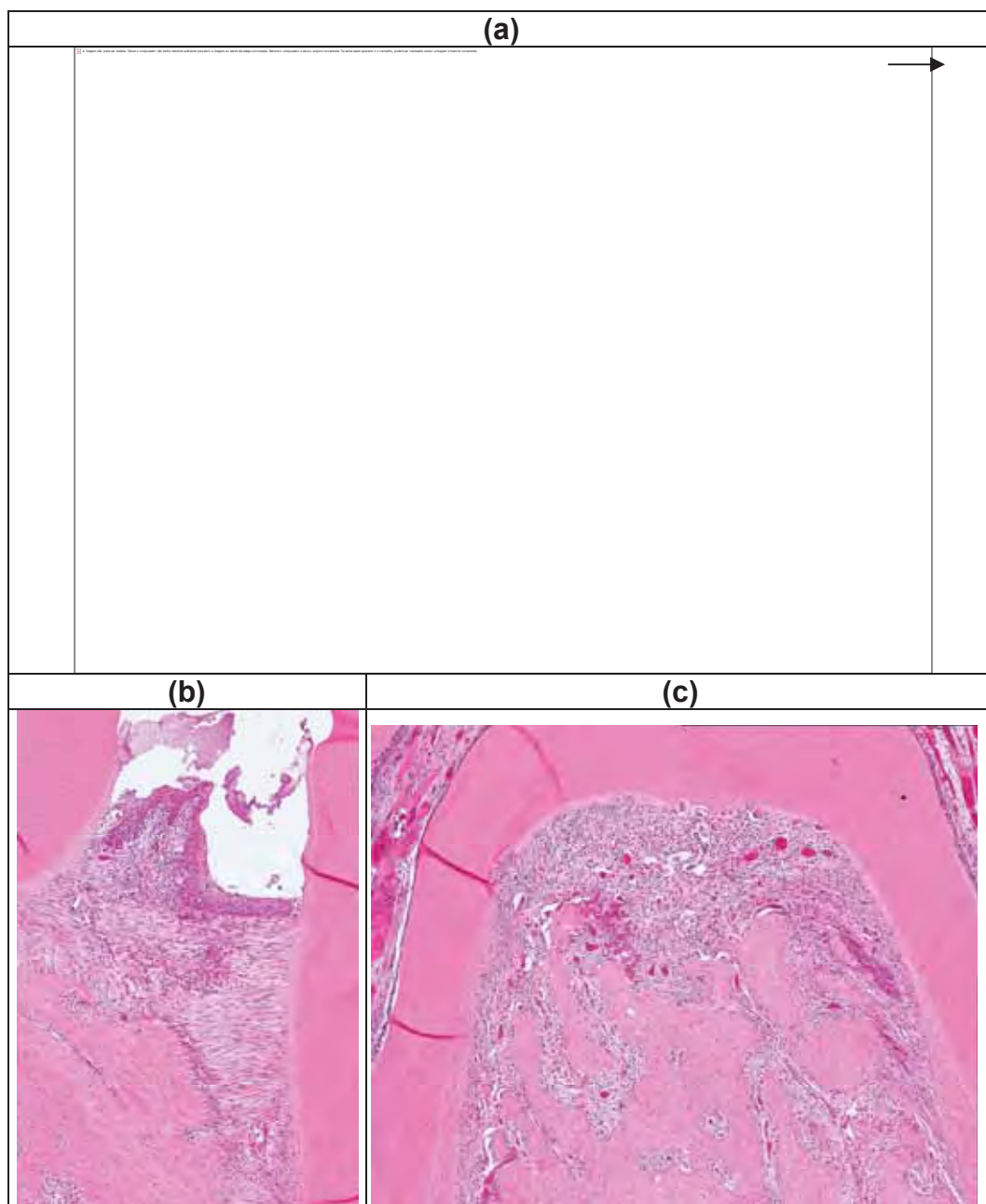


Figura 15 – **Diabetes-Laser. 14 dias.** Fotomicrografia exibindo região do 1º molar inferior (a) mostrando papila interproximal entre os 1º e 2º molar ES inferiores (b) e furca do 1º molar inferior com aspecto normal. Aumento original: 100x; H.E.

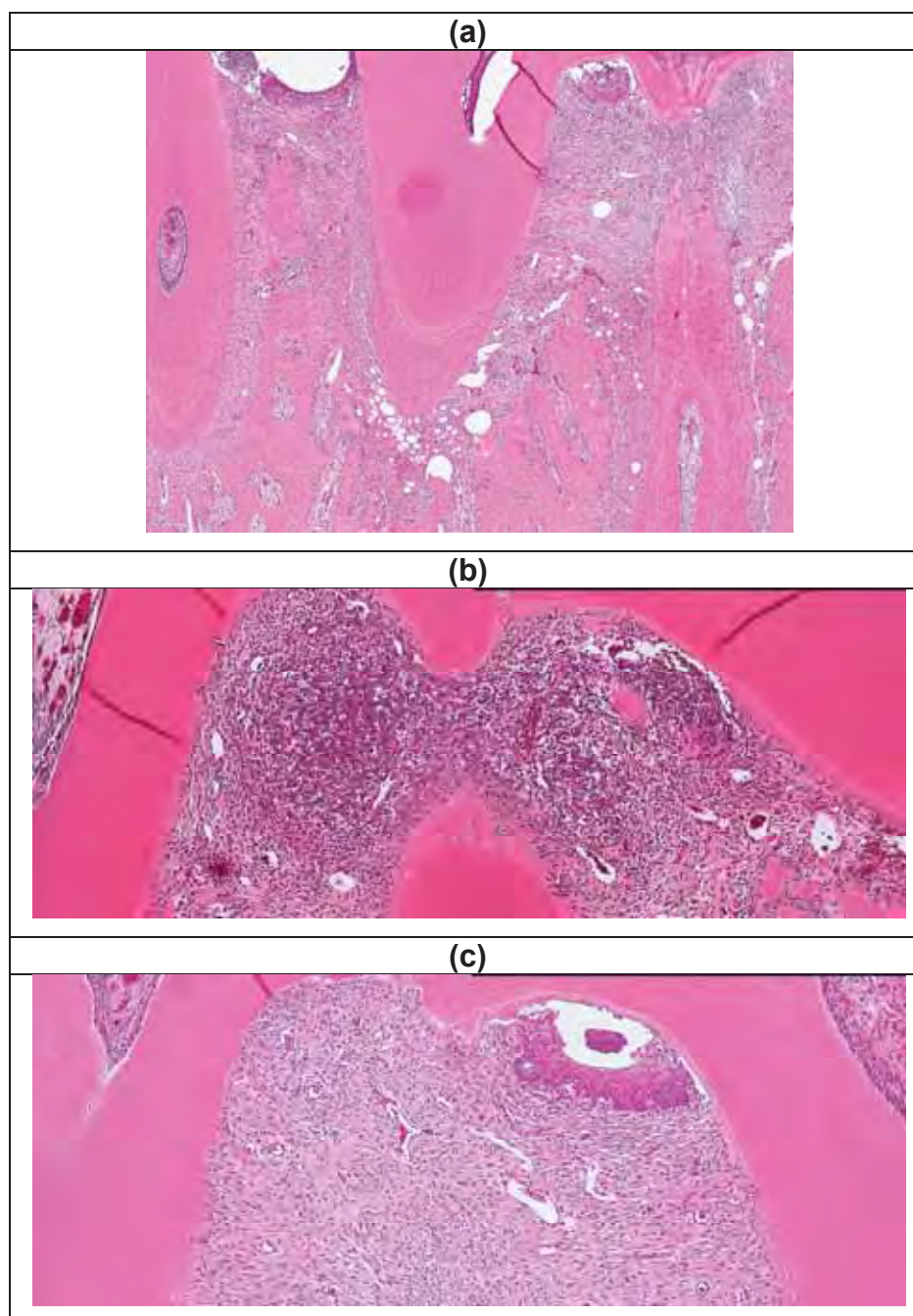


Figura 16 – **Diabetes-Laser. 14 dias.** Fotomicrografia exibindo regiões interproximal, entre os 1º e 2º molares inferiores (a) e de furca (b) em diferentes animais diabéticos tratados com radiação laser. Aumento original: 100x; H.E.

21 dias

No grupo **Controle**, observávamos que as paredes ósseas do periodonto de sustentação do 1º molar inferior encontravam-se reabsorvidas devido à atividade osteoclástica, desenvolvendo bolsas periodontais de tamanhos variados e tipos vertical e horizontal. O epitélio juncional mostrava-se hiperplásico exibindo alongamento e anastomose de suas projeções, degeneração hidrópica e exocitose. A lâmina própria era constituída, predominantemente, por tecido conjuntivo frouxo com intenso infiltrado de células inflamatórias e numerosos vasos sanguíneos. Todavia, notava-se que alguns fragmentos exibiam tecido de granulação, principalmente, em regiões com comprometimento de furca do 1º molar inferior, além de evidentes reabsorções radiculares externas. Neoformação de tecido ósseo na região de furca do 1º molar eram observados na maioria dos animais, exibindo trabéculas ósseas delicadas e irregulares. As fibras colágenas do ligamento periodontal da região interproximal dos 1º e 2º molares foram destruídas, permanecendo as fibras oblíquas e periapicais. Em adição, hipercementoses estavam presentes e limitadas na porção apical das raízes envolvidas na movimentação. Colonização microbiana na superfície dos tecidos gengivais completava o quadro histológico (Figura 17).

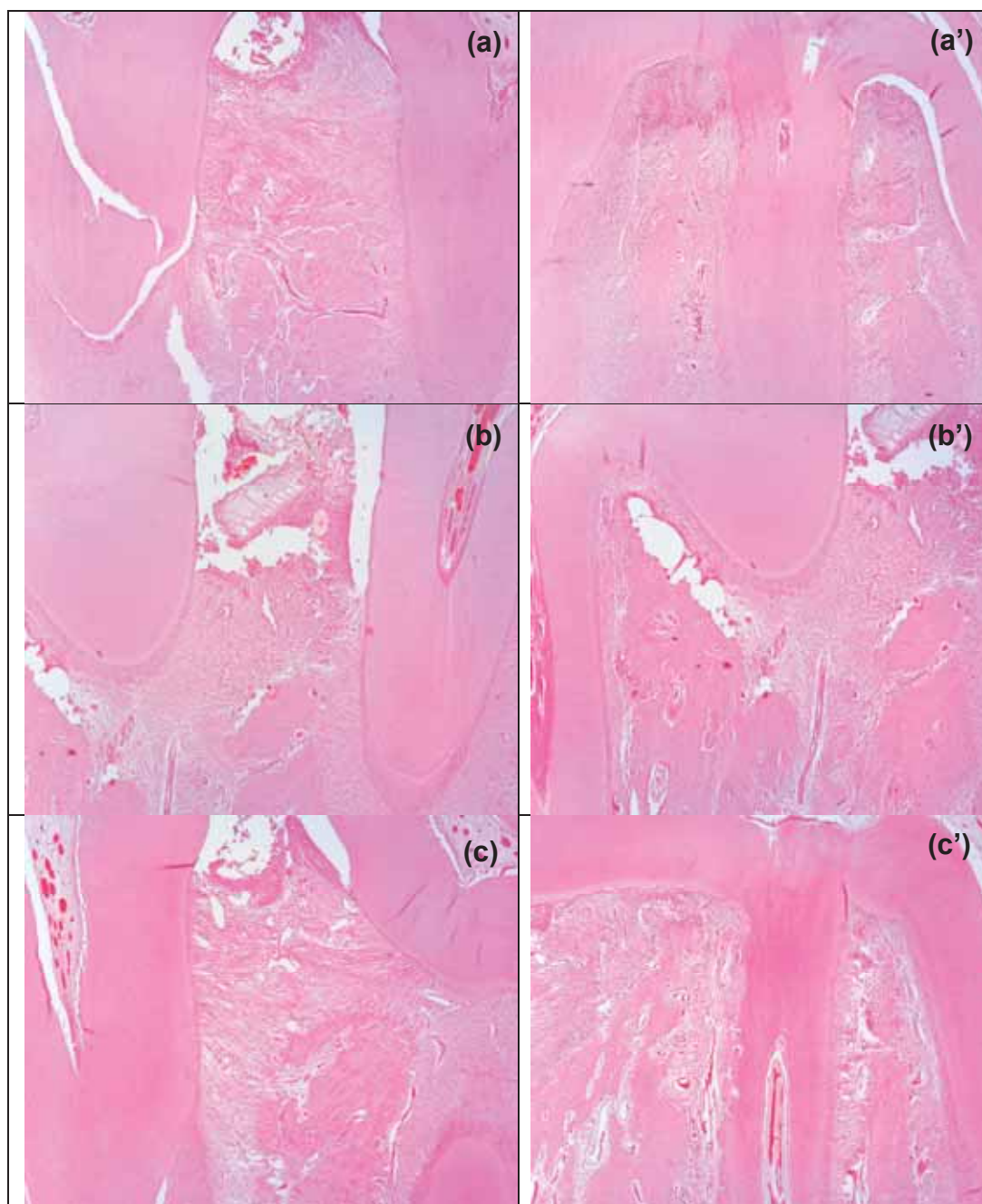


Figura 17 – **Controle. 21 dias.** Fotomicrografias das regiões interproximal, entre os 1º (esquerdo) e 2º (direito) molares inferiores (a, b, c), e de furca do 1º molar inferior (a', b' e c') de ratos saudáveis, após movimentação ortodôntica. Aumento original: 50x; H.E.

No **grupo Laser**, os espécimes exibiam gengiva livre Interproximal, entre o 1º e 2º molares inferiores, de aspecto filiforme, estava revestida por epitélio estratificado não queratinizado, exibindo poucas camadas de células, além de projeções de cristas epiteliais interligando-se entre si. Algumas áreas de acantoses e exocitoses eram, também, evidenciadas em alguns cortes histológicos, além de alongamento do epitélio juncional em caso de discreta perda de crista óssea alveolar. Nas adjacências, 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 na região interproximal dos 1º e 2º molares inferiores, sendo composto por tecido conjuntivo frouxo e fibras colágenas com arranjo desorganizado. O ligamento periodontal apresentava espessamento contínuo em todo o contorno do dente envolvido na movimentação ortodôntica. Esta estrutura era constituída por tecido conjunto frouxo, bem celularizado e vascularizado, com infiltrado de raras células inflamatórias mononucleares. Notava-se que houve formação contínua de formação de tecido ósseo nas regiões interproximal do 1º e 2º molares inferiores e de furca do 1º molar inferiores, sem que houvesse quaisquer prejuízos na histomorfologia do periodonto de sustentação, durante o período de 21 dias de movimentação ortodôntica (Figuras 18 e 19).

(a)

(a')

(b)

(b')

(c)

(c')

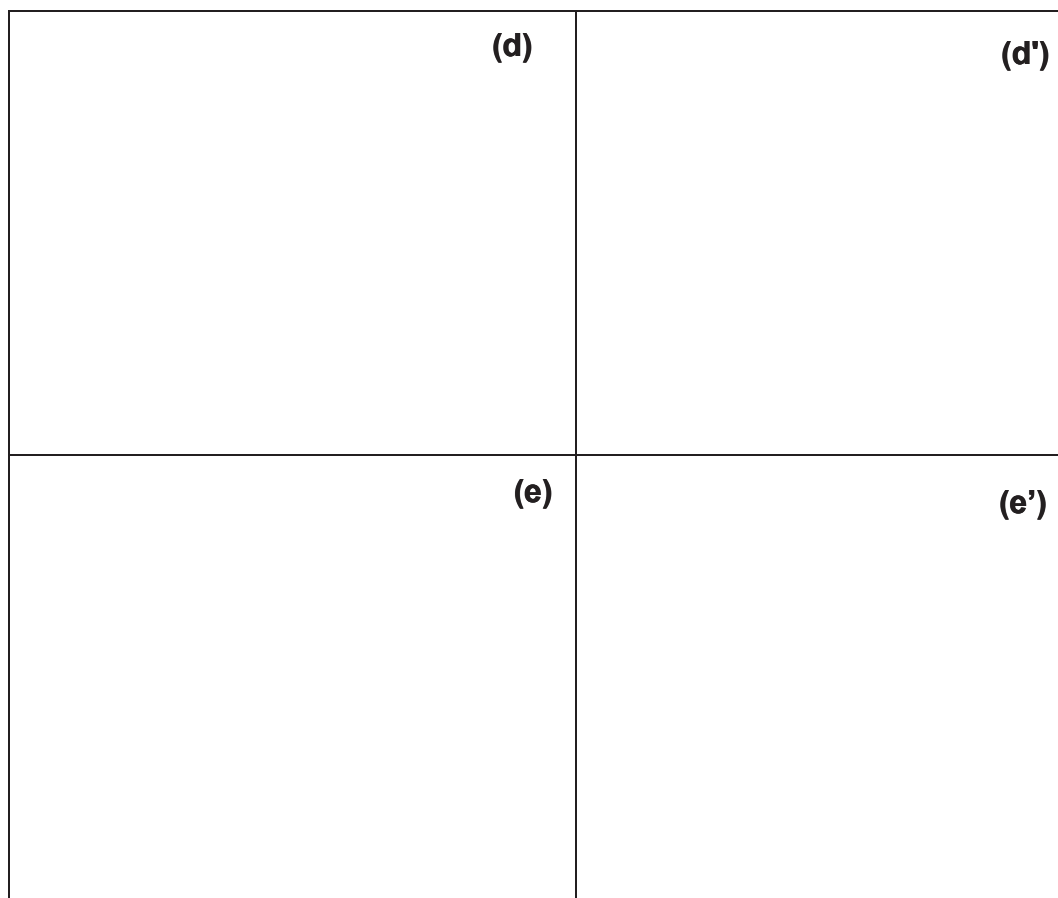


Figura 19 – **Laser. 21 dias.** Fotomicrografias das regiões interproximal, entre os 1º (esquerdo) e 2º (direito) molares inferiores (d, e), e de furca do 1º molar inferior (d', e') de diferentes ratos saudáveis, após movimentação ortodôntica. Aumento original: 50x; H.E.

No **grupo Diabetes**, os aspectos histológicos eram semelhantes ao grupo controle, entretanto notava-se que, alguns espécimes, exibiam extensas perdas ósseas da parede alveolar entre os 1º e 2º molares inferiores, resultando no significativo comprometimento da área de furca do 1º molar inferior (Figuras 20 e 21).

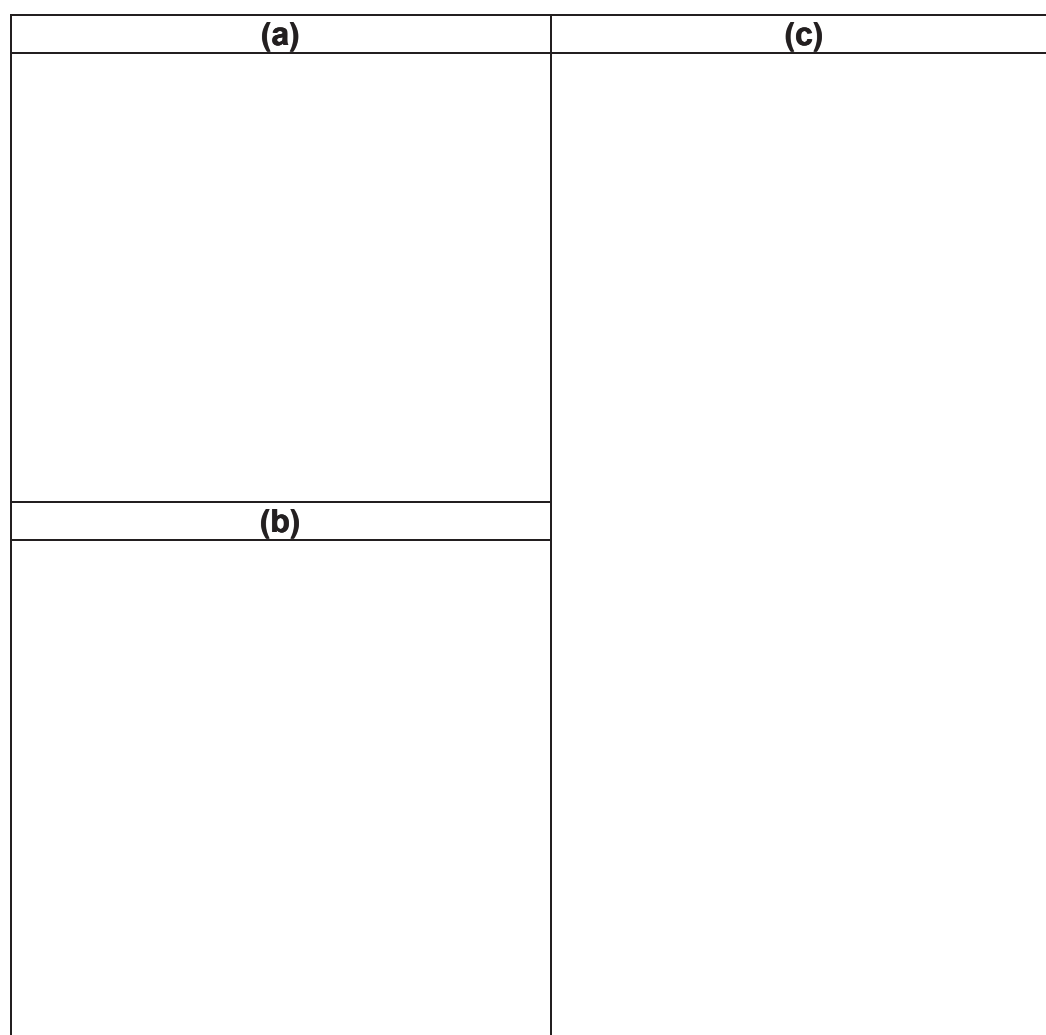


Figura 20 - **Diabetes. 21 dias.** Aspectos histológicos variáveis da região interproximal (a, b e c), entre os dentes 1^o (direito) e 2^o molares inferiores de diferentes ratos diabéticos, após movimentação ortodôntica. Aumento original: 50x; H.E.

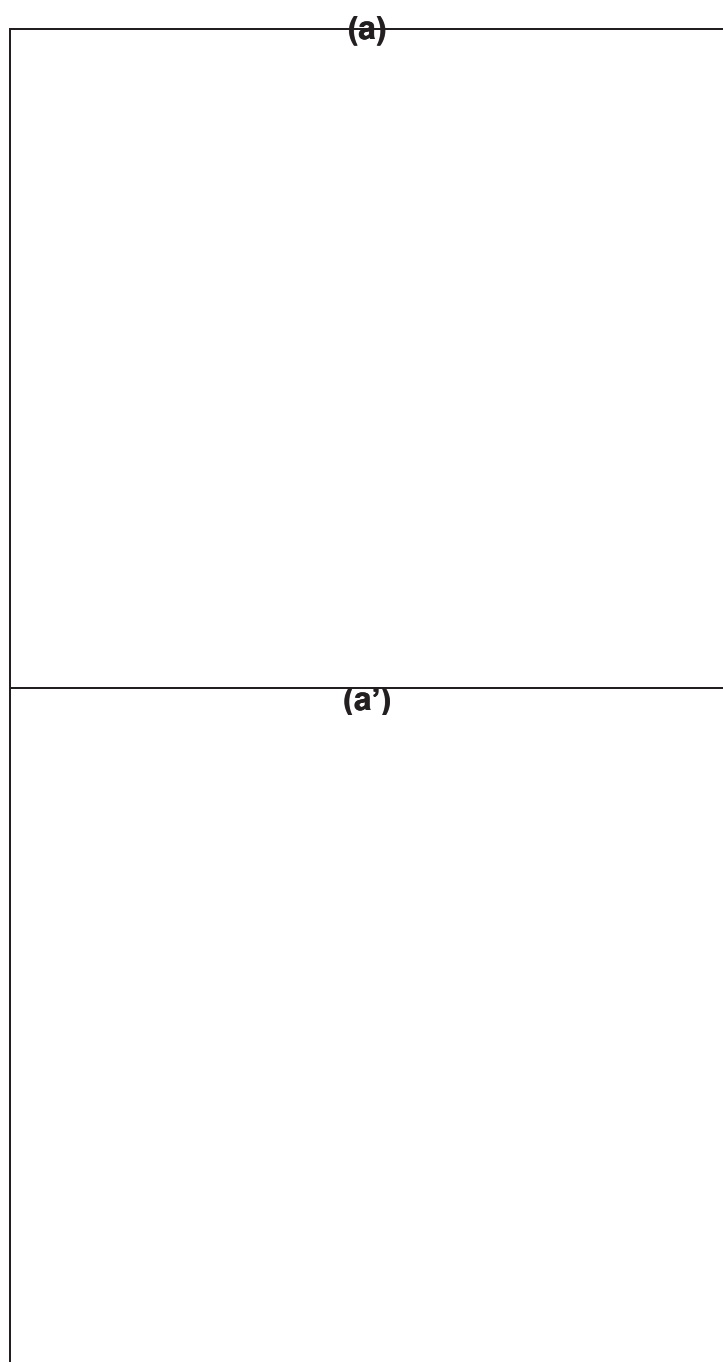


Figura 21 - Diabetes. 21 dias. Aspectos histológicos da região de furca do 1º molar inferior movimentado de ratos diabéticos (a e a'). Aumento original: 50x; H.E.

No **grupo Diabetes+Laser**, os espécimes mostravam de discreta a moderada destruição óssea da parede alveolar entre os 1º e 2º molares inferiores e da região de furca do 1º molar inferior. Intensa atividade osteoclástica está evidenciada, principalmente, em áreas com presença de tecido de granulação e, conseqüentemente, devido às perdas teciduais do periodonto de sustentação. Todavia, verificava-se que a maioria dos espécimes exibia preservação da região de furca do 1º molar inferior e do espaço biológico. 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 (Figuras 22 e 23).

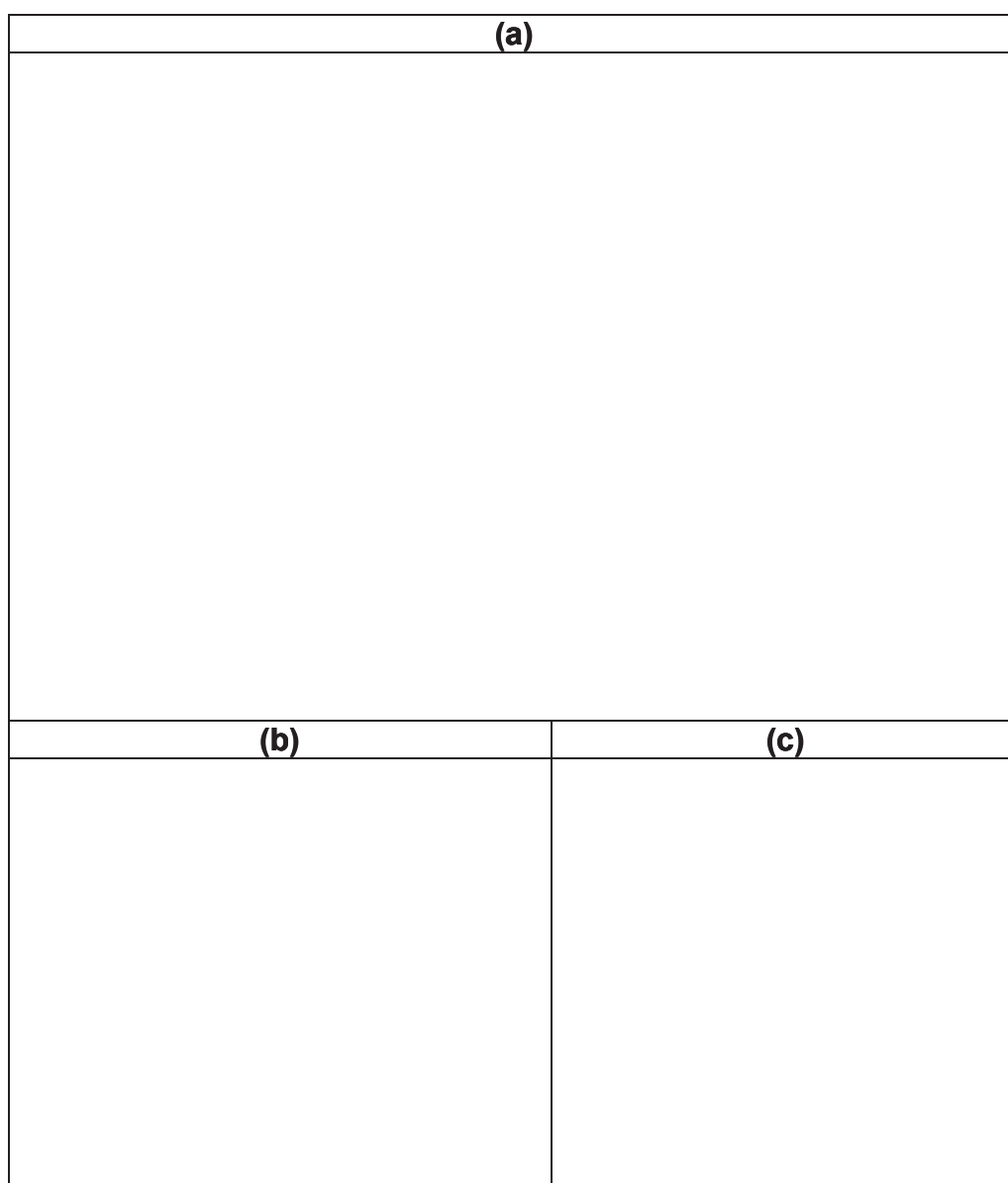


Figura 22 – Diabetes-Laser. 21 dias. Fotomicrografias exibindo preservação do periodonto de sustentação entre os 1º e 2º molares inferiores (a) com formação de tecido ósseo nas regiões interproximal (b) e de furca (c) de ratos diabéticos, após movimentação ortodôntica e tratamento com radiação laser. Aumento original: 50x e 100x; H.E.

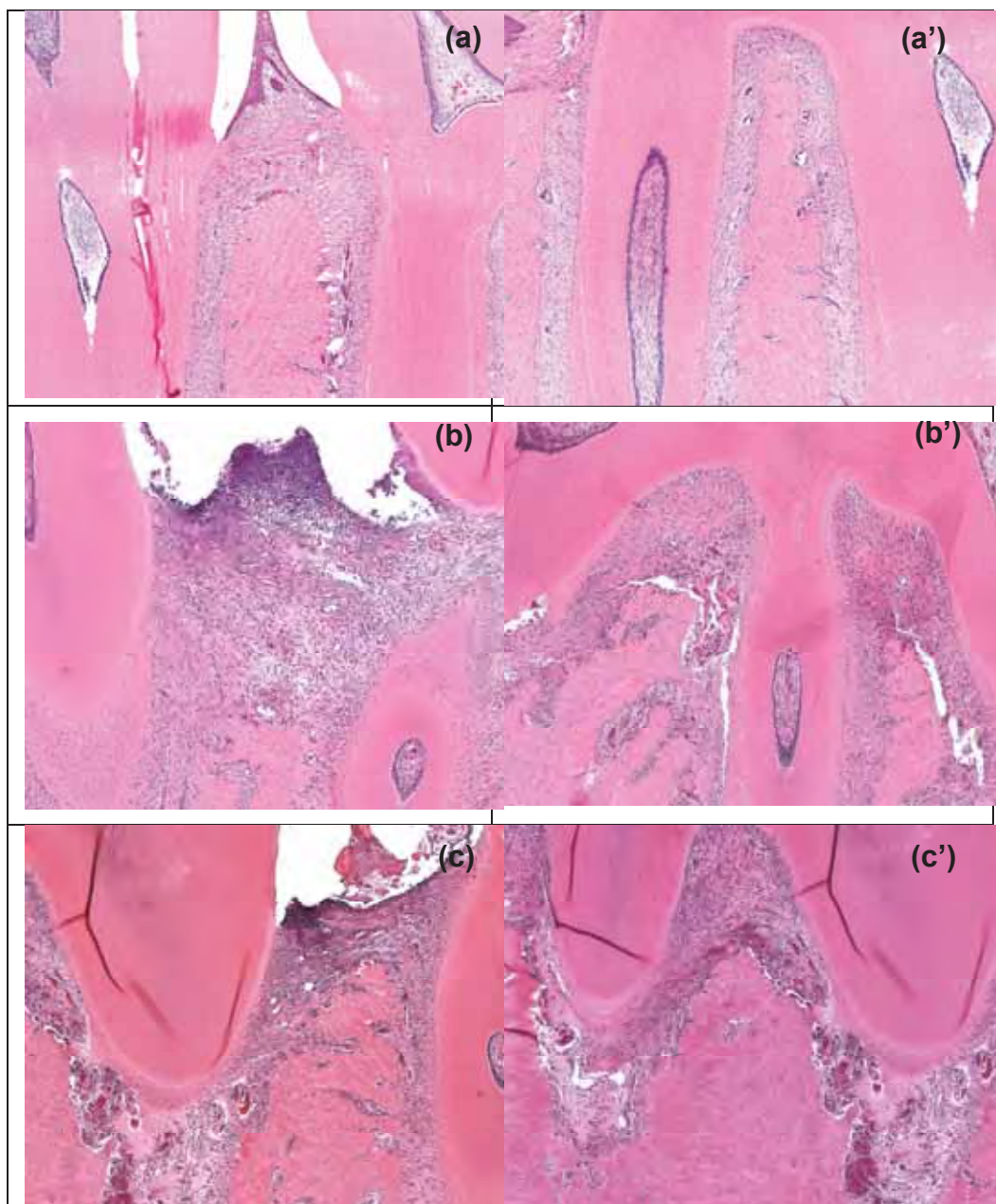


Figura 23 – **Diabetes-Laser. 21 dias.** Fotomicrografias das regiões interdental, entre os 1º e 2º molares inferiores (a, b, c) e de furca do 1º molar inferior (a', b', c') de diferentes ratos diabéticos, após movimentação ortodôntica e tratamento com radiação laser. Aumento original: 50x; H.E.

5.3 Análise Imunohistoquímica

Para este estudo, realizamos as análises estatísticas das contagens dos números osteócitos imunorreativos ou não para OPN, em 3 campos nas seguintes regiões: cervical, terço médio e apical da região interdental entre primeiro e segundo molar inferior direito e região de furca, após 7, 14 e 21 dias de movimentação ortodôntica nos ratos de todos os grupos estudados (Figura 24).

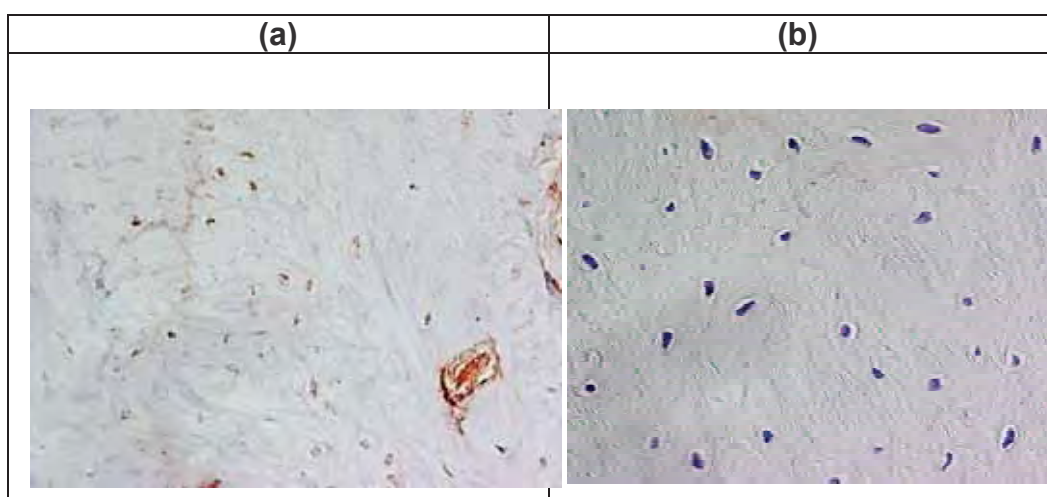


Figura 24 – Fotomicrografia exibindo osteócitos imunorreativos para OPN (a) e osteócitos não imunorreativos (b), localizados no terço médio da parede do tecido ósseo alveolar, adjacente ao ligamento periodontal (LP) da raiz distal do 1º molar inferior do lado direito. Aumento original: 400x

Os resultados das tabelas 3 e 4 mostraram que aos 7 e 14 dias, o grupo laser foi superior, estatisticamente, aos demais grupos nos mesmos períodos de observação. Entretanto, aos 7 e 14 dias, os animais do grupo diabético laser obtiveram resultados estatísticos semelhantes aos animais do grupo controle. Aos 21 dias o nível de significância foi semelhante entre os grupos controle e diabético laser, e também, entre os grupos controle e laser. Contudo, os animais do grupo diabético obtiveram

valores estatísticos menores que os demais grupos neste período estudado.

Tabela 3 – Teste de Tukey dos resultados histomorfométricos da imunohistoquímica, referentes aos osteócitos imunorreativos ou não para OPN, após movimentação ortodôntica, em todos os grupos estudados. Nível de significância estatística (*P*).

GRUPOS	NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA (<i>P</i>)		
	7 Dias	14 Dias	21 Dias
C x D	$P > 0.05$	$P < 0.001$	$P < 0.05$
C x L	$P < 0.001$	$P < 0.05$	$P > 0.05$
C x D-L	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$
D x L	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.05$
D x D-L	$P > 0.05$	$P < 0.001$	$P < 0.01$
L x D-L	$P < 0.001$	$P < 0.05$	$P > 0.05$

• C: Controle; L: Laser ; D: Diabetes; D-L: Diabetes -Laser

Tabela 4 – Análise de Variância (ANOVA), referentes ao número de osteócitos imunorreativos ou não para OPN, após movimentação ortodôntica, em todos os grupos estudados (n=3).

GRUPOS	Osteócitos imunorreativos ou não para OPN		
	7 Dias	14 Dias	21 Dias
C	17,63 ± 1,53	19,70 ± 0,43	13,53 ± 0,65
L	24,20 ± 2,86	23,43 ± 0,70	13,62 ± 1,33
D	17,23 ± 0,51	13,37 ± 0,47	9,82 ± 1,17
D-L	17,70 ± 0,87	19,57 ± 0,32	14,72 ± 0,82

• C: Controle; L: Laser ; D: Diabetes; D-L: Diabetes -Laser.

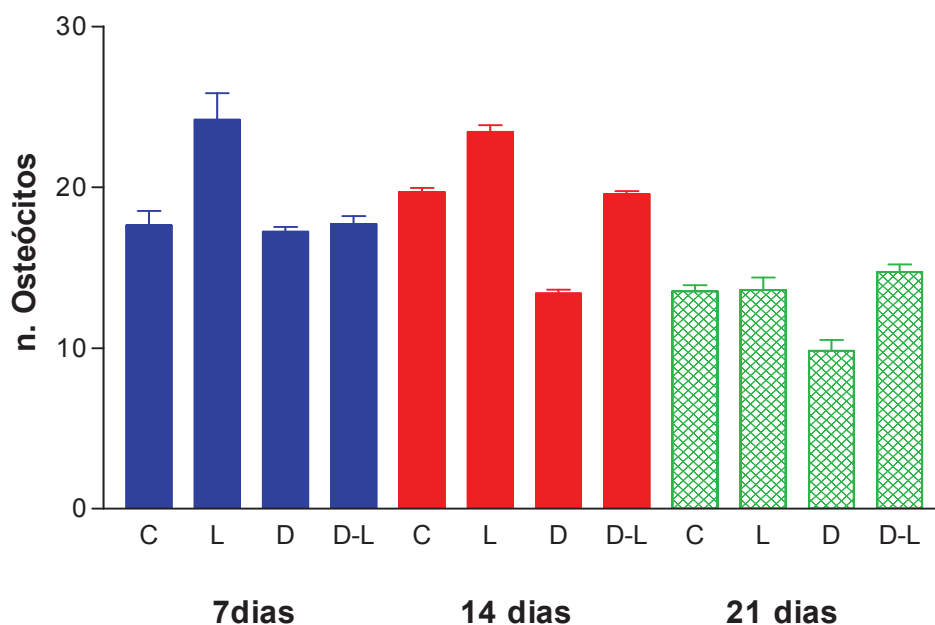


Figura 25 - Representação gráfica dos valores médios do número de osteócitos imunorreativos ou não para OPN, em todos os grupos estudados.

6 DISCUSSÃO

A pesquisa desenvolvida avaliou os efeitos da radiação laser de baixa potência nos tecidos periodontais de ratos diabéticos, induzidos por aloxano e submetidos a uma força mecânica. Na literatura consultada, poucos trabalhos foram encontrados utilizando a laserterapia em periodonto de indivíduos portadores de diabetes, submetidos à movimentação dentária induzida. Por isso, despertou-nos o interesse em conhecer a ação da movimentação ortodôntica em um quadro de doença crônica como o diabetes, bem como avaliar se a laserterapia pode auxiliar na manutenção da qualidade dos tecidos periodontais.

Segundo a literatura existem várias maneiras de induzir *Diabetes mellitus* (DM), destacando-se, a administração de drogas como o aloxano e a estreptozotocina, a pancreatectomia parcial e infecções virais. Em nossos estudos, optamos pela administração do aloxano devido a sua eficiente ação citotóxica seletiva sobre as células- β das ilhotas de Langerhans do pâncreas. O esquema de administração da droga, e os procedimentos de indução do diabetes empregados, nesta pesquisa, estão de acordo com metodologias descritas na literatura utilizando-se o rato como modelo experimental (Johnson, 1992; Feng, 2006; Sakaguchi, 2007; Tominaga, 2007; Sabino et al., 2009).

Baseados em artigos científicos, utilizamos a dose de 40 mg/Kg, a qual pode garantir a indução e a manutenção do quadro diabético, por um longo período. O método eficaz encontrado para o procedimento de indução do DM foi a administração endovenosa do aloxano, na veia peniana, o que propiciou boas condições de sobrevivência para o animal. Este método apresentou-se adequado para este estudo, uma vez que mais de 95% dos animais submetidos ao tratamento com a

referida droga, tornaram-se portadores do DM. Esta droga diabetogênica foi, também, utilizada nos estudos de Duarte et al., 2005; Maiya et al., 2005; Almeida et al., 2008; Amorin et al., 2009.

Clinicamente, os animais apresentaram complicações como: fraqueza, prostração, poliúria, polifagia, polidipsia, evacuação freqüente, alteração na textura da pelagem e distensão abdominal. Esses achados clínicos, também, foram observados nos estudos de Amorim et al. (2009).

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. Ressalvamos que no planejamento ortodôntico em indivíduos que apresentam distúrbios metabólicos, como o DM, possuem significativas alterações teciduais no periodonto, as quais devem ser consideradas.

Segundo Lu et al. (2003), 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. Em adição, a ausência do gene de expressão que regula a diferenciação osteoblástica tem interferido nos processos de reparação óssea de pacientes diabéticos (Robbins, 1989; Verhaeghe e Bouillon, 1996; Karjalainen e Knuuttila, 2000).

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; Bench 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 (Guyton e Hall, 1997; Carvalheira et al., 2002; 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 ósseo, ou seja, no desequilíbrio na formação de osteóide e na homeostase mineral óssea (Margonar et al., 2003; Heap et al., 2004; Thrailkill et al., 2005; Abassy et al., 2010). A intensidade dessas alterações pode provocar quadros agudos de osteopenia e, conseqüentemente, osteoporose (Verhaeghe e Bouillon, 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).

Entre as teorias que explicam como a hiperglicemia crônica conduz aos danos celulares e teciduais observados na DM, a formação dos AGEs é considerado um dos mais importantes. Estes 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. Ademais, 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) e Nakajima et al. (2006).

Em nossos resultados, constatamos que a distância linear da movimentação ortodôntica nos animais diabéticos foi maior do que todos os animais dos demais grupos, principalmente, aos 21 dias de observação. Entretanto, a formação óssea correspondente a quantidade de movimentação foi insuficiente. Desta maneira, pode-se intuir que formação óssea do grupo diabético não foi satisfatória para garantir qualidade dos tecidos periodontais durante a movimentação ortodôntica.

Considerando, ainda, o estímulo da laserterapia, foi observado que, nos animais dos grupos Laser e Diabetes Laser, as atividades osteoblásticas nas áreas de tensão e osteoclásticas nas áreas de pressão dos ligamentos periodontais foram concomitantes, promovendo formação e reabsorção óssea durante a movimentação ortodôntica, nos períodos de 7, 14 e 21 dias. É importante salientar que todos os animais do grupo Laser exibiram ausência de doença periodontal.

Ressalva-se que a radiação laser aplicada no periodonto de sustentação favoreceu os processos de reabsorção e neoformação óssea, superando os resultados dos aspectos histológicos dos animais dos grupos controle, visto que, algumas animais exibiam moderada doença periodontal, nas regiões interproximal entre os 1º e 2º molares inferiores e furca do 1º molar movimentado. Em relação aos animais do grupo diabéticos, notava-se maior preservação dos tecidos periodontais nos

animais diabéticos irradiados do que os não irradiados, comprovando a efetividade da laserterapia durante a movimentação ortodôntica, em todos os períodos de observação.

Em relação a densidade de energia da irradiação laser, verificamos que o valor de densidade de 20 J/cm^2 foi adequada e eficaz na biorregulação ou normalização das funções celulares, contribuindo positivamente na regeneração dos tecidos periodontais, durante a aplicação de força ortodôntica. 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 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, espessura da camada de cemento (hipercementose) 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.

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. Portanto, sugerimos que o protocolo da laserterapia de densidade de energia de

20J/cm² seja uma ferramenta auxiliar na prática clínica na área da Ortodontia.

7 CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais desta pesquisa, os resultados obtidos nos permitiram concluir que:

- a movimentação ortodôntica foi maior nos animais do grupo diabete do que nos demais grupos, entretanto a qualidade da microarquitetura dos tecidos periodontais foram indesejáveis;
- a aplicação da radiação laser AsGaAl no periodonto de ratos diabéticos submetidos à força ortodôntica de 20 cN, promoveu melhor preservação e integridade da microarquitetura dos tecidos periodontais quando comparado com os animais do grupos diabetes, todavia foi semelhante aos resultados histológicos dos animais do grupo controle.
- o número de osteócitos imunorreativos para a osteopontina foi maior no grupo Laser do que no grupo Diabético.

8 REFERÊNCIAS *

Abbassy MA, Watari I, Soma K. The effect of diabetes mellitus on rat mandibular formation and microarchitecture. *Eur J Oral Sc.* 2010;18:364-9.

Akyol U, Güngörmüş M. The effect of low-level laser therapy on healing of skin incisions made using a diode laser in diabetic rats. *Photomed and Laser Surg.* 2010;28(1):51-5.

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.

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

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

Andersen, CCP, Flyvbjerg A, Buchard K. Relation ship between periodontitis and diabetes: lessons from rodent studiesRodent models of periodontitis and diabetes. *J Periodontol.* 2007;78(7):1264-75.

* 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

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

Bayat M, Abdi S, Javadieh F, Mohsenifar Z, Rashid MR. The effects of low-level laser therapy on bone in diabetic and nondiabetic rats. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(5):703-8.

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

Bjordal 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.

Bosshardt DD, Nanci A. Immunolocalization of epithelial and mesenchymal matrix constituents in association with inner enamel epithelial cells. *J Histochem Cytochem*. 1998;46(2):135-142.

Braga SM, Taddei SR, Andrade I Jr, Queiroz-Junior CM, Garlet GP, Repeke CE, Teixeira MM, da Silva TA. Effect of diabetes on orthodontic tooth movement in a mouse model. *Eur J Oral Sci*. 2011;119(1):7-14.

Carvalho JBC, Zecchin HG, Mario, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002;46(4):419-25.

Chung JW, Kim MS, Piao ZH, Jeong M, Yoon SR, Shin N, Kim SY, Hwang ES, Yang Y, Lee SH, Kim YS, Choi I. Osteopontin promotes the development of natural killer cells from hematopoietic stem cells. *STEM CELLS*. 2008;26(8):2114-23.

Consolaro A. Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. Maringá. Dental Press. 2002;153-178.

Cruz DR, Kohara E, Ribeiro M. Effects of low-intensity laser therapy on the orthodontic movement velocity of human teeth: a preliminary study. *Lasers Surg Med.* 2004;23(35):117-120.

Damante CA. Avaliação clínica dos efeitos do laser em baixa intensidade (GaAIs) na cicatrização de gengivoplastia em humanos *J. Appl Oral Sci*, 2004; 23(2):133-6.

Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest.* 2001;107(9):1055-61.

Dodds RA, Connor JA, James IE, Rykaczewski EL, Appelbaum E, Dul E, Gowen M. Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *J Bone Mineral Res.* 1995;10(11):1666–80.

Duarte VMG, Ramos AMO, Rezende LA, Macedo UBO, Brandão-Neto J, Almeida MG, et al. Osteopenia: a bone disorder associated with diabetes mellitus. *J Bone Mineral Metab.* 2005; 23(1):58-68.

Feng Z. Effect of diabetes mellitus on orthodontic tooth movement in rats with diabetes. *Diabetes Technol Ther.* 2010; 12: 65–73.

Ferreira AN, Silveira L, Genovese WJ, de Araújo VC, Frigo L, de Mesquita RA, Guedes E. Effect of GaAIs laser on reactional dentinogenesis induction in human teeth. *Photomed Laser Surg.* 2006;Jun;24(3):358-65.

Fiorellini JP Melsen B Obara E. The effect of insulin therapy on osseointegration in a diabetic rat model. Clin Oral Implants Res. 1999;10(5):362-68.

Fujihara S, Yokozeki M, Oba Y, Higashibata Y, Nomura S, Moriyama K, Function and regulation of osteopontin in response to mechanical stress. J Bone Mineral Res. 2006;21(6): 956–64.

Giachelli CM · Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. Matrix Biology. 2000;19(7):615-22.

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.

Gimenez, CMM , Murad I, Meireles BR, Morais FA, Junqueira JLC Santos ECA. Principais alterações sistêmicas relacionadas com a movimentação dentária induzida. RGO. 2007;55(2):75-9.

Gotz S. Insulin-like grow factor system components in the periodontium during tooth root resorption and early repair process in rat. Eur J Oral Sci 2006;114(4):318-27.

Goulart CS. Photoradiation and orthodontic movement: experimental study with canines. Photomed Laser Surg. 2006;24(2):192-6.

Gregg EW, Mangione CM, Cauley JA, Tjompson TJ, Schwartz AV, Ensud KE, Nevitt, MC, Diabetes and incidence of functional disability in older women. Diabetes Care. 2002;25(1):61-5.

Gregghi SLA, Brito MCT, Oliveira MR, Guimarães MCM. Relação entre diabetes mellitus e doença periodontal. Rev APCD 2006;56(4):265-9.

Gugliucci A Glycation as glucose link to diabetic complications. JAOA. 2000;100(10):621-34.

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

Heap J, Murray MA, Muller SC, Jalili T, Moyer Miller LJ. Alterations in bone characteristics associated with glycemic control in adolescents with type I 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(1):299-306.

Hiraoka CM. Estudo das alterações dos tecidos periodontais durante a movimentação ortodôntica em ratos diabéticos. [dissertação de mestrado] São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade Paulista UNIP., 2007.

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

Holthgrave EA, Donath K. Periodontal reaction to orthodontic forces in diabetics metabolism state . Fortschr Kieferorthop. 1989;50(1):326-37.

Johnson RB. Morphological characteristics of depository surface of alveolar bone of diabetic mice. J Periodont Res. 1992;27(1):40-7.

Karu TI. Primary and secondary mechanism of action of visible to near radiation on cells J Photchem Photobiol. 1999;49(2):1-17.

Karjalainen K, Knuuttila M. Alveolar bone loss in type 1 diabetic subjects. J Clin Periodontol. 2000; 27(8):567–571.

Kawamura JY, Magalhães MHCG. Diabetes mellitus e doença periodontal:revisão de literatura. Diabetes Clínica. 2002;6(1):440-4.

Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B, D'Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. J Clin Periodontol. 2003;30(4):353–8.

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

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

Lorenzi M, Glucose toxicity in vascular complications of diabetes: the cellular perspective. Diabetes Metab Ver. 1992;22(8):85-103.

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

Madeiro AT, Bandeira FG, Figueiredo CRLV. A estreita relação entre diabetes e doença periodontal inflamatória. Odontologia. Clín. Científ. 2005;4(1):07-12.

Maiya, G.A. Effect of low intensity helium-neon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(2):187–190.

Maraschin J.F, Murussi N. Witter V, Silveiro SP. Classificação do diabetes mellito. *Arq Brasil de Cardiol.* 2010;95(2):40-7.

Margonar R, Sakakura CE, Holzhausen M, Pepato MT, Cândia AR Jr, Marcantonio EJr. The Influence of Diabetes Mellitus and Insulin Therapy on Biomechanical Retention Around Dental Implants: A Study in Rabbits. *Implant Dentistry. Basic and Clinical Research.* 2003; 12(4):333-339

McKee MD, Nanci A, Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: Ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair .*Microscopy Research and Technique.* 1996;33(2):141–64.

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

Misawa Y, Kageyama T, Moriyama K, Kurihara S, Yagasaki H, Deguchi T, et al.. Histomorphometric study on the effects of ages on orthodontic tooth movement in rats. *Eur J Oral Sci.* 2007;115(2):44-50.

Miserendino LJ, Pick RM. *Lasers in Dentistry.* Quintessence. 1995.

Moraes FF, Chaves VEA, Fava M, Fundamentos Histológicos Aplicados à ortodontia. Interlandi S. *Ortodontia bases para iniciação* 5. ed. São Paulo: Artes Médicas. 2002;p.89-100.

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 vivious cycle. Inter Med. 2010;49(1):881-5.

Nakajima K, Hamada N, Takahashi Y, Sasaguri K, Tsukinoki K, Umemoto, T. Restraint stress enhances alveolar bone loss in an experimental rat model. J Periodontol Res 2006;46:527-534.

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.

Ninomiya T, Hosoya A, Nakamura H, Sano K Nishisaka T, Ozawal Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused a decreased osteoblast number and an activated osteoblast. Bone 2007;40(1):140-8.

Ozawa YA, Shimizu NA, Kariya GA, Abiko YB. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial. Cells.1998;22(4):347-54.

Pinheiro ALB, Gerbi MEMM. Photoengineering of bone repair process. Photomed Laser Surg. 2006;24(2):169-78.

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

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

Ramasamy R, Vannucci SJ, Yan SSD, Herold K, Yan SF, Schmidt AM. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. Glycobiology vol. 2005; 15(7):16–28.

Reddy GK. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. Surg and Med. 2003;33(5):344–51.

Reinehr T, Kiess W, Sousa G, Stoffel-Wagner B. Intima media thickness in childhood obesity: Relations to inflammatory marker, glucose metabolism, and blood pressure. Metabolism. 2006;55(1):113-8.

Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegård D. Osteopontina possible anchor of osteoclasts to bone. PNAS. 1990;87(12):4473-75.

Reitan K, Biomechanical principles and reactions. In Grabber TM, Swain BF. Orthodontics: currents principles and technique, St Louis: The CV Mosby. 1985. cap 3 p. 193-227.

Robbins SL. Patologia estrutural e funcional 4 ed Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.

Robertson C, Drexler AJ, Vernillo AT. Update on diabetes diagnosis and management. J Dent Assoc. 2003;134(16):23.

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 (Porto Alegre). 2010;20(2):161-5.

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.

Sabino KR, Machado AN, Petroianu A, Alberti LR, Simal CJR. Influence of acute alcoholism in the phagocytic function of the mononuclear phagocyte system in an experimental model / Influência do alcoolismo agudo na função fagocitária do sistema mononuclear fagocitário em modelo experimental. Einstein. 2009;7(2):187-9.

Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells – a brief history and perspective. Eur J Immunol. 2007;37(1):116–23.

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

Shimizu N, Mayahara K, Kiyosaki T, Yamaguchi A, Ozawa Y, Abiko Y., Low- Intensity laser irradiation stimulates bone nodule formation via insulin-Like growth factor-I expression in rat calvarial cells. Laser Surg Med. 2007;39(1):551-9.

Ship J.A. Diabetes and oral health. An overview. Journal of American Dent Assoc. 2003;134(1):4-10.

Soares JCM, Costa ST, Cecim M. *Syzygium jambolanum* / Glucose and cholesterol plasma levels in rats with alloxan-induced Diabetes mellitus treated with infusion of *Bauhinia candicans* or *Syzygium jambolanum*. *Ciênc. rural*. 2000;30(1):113-8.

Sodek J, Gans S, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(3):279-303.

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

Takada T, Yoshinari N, Sugiishi S, Kawase H, Yamane T, Noguchi T. Effect of restraint stress on the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2004;75:306-315.

Terai K, Takano-Yamamoto T, Ohba Y, Hiura K, Sugimoto M, Sato M, et al. Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress. *J Bone Min Res*. 1999;14(6):839-49.

Thrall 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(1):2875-81.

Tominaga M. Histopathological study on experimental tooth movement in the spontaneously diabetic rat. *J Fukuoka Dent College*. 2007;22(2):247-268.

Vernillo AT. Dental considerations for the treatment of patients with diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc*. 2001;134(1):24S-33S.

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

Verna C., Dastra M, Melsen B. Bone turnover rate in rats does not influence root resorption. Eur J Orthod. 2003;25(1):359-63.

Vieira V, Guerreiro D, Silva P. Pessoas com Diabetes Mellitus: suas escolhas de cuidados e tratamentos. Rev. bras. enferm. 2006;59(3):297-302.

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.

Villarino ME, Lewick M, Ubios AM. Bone response to orthodontic forces in diabetic wistar rats. AJO-DO. 2011;139(4):76-82.

Walsh LJ. The current status of laser application in dentistry.. Aust Dental J. 2003;48(3),146-55.

Weiland F. Constant versus dissipating forces in orthodontics: the effect on initial tooth movement and root resorption Eur J Orthod. 2003;25(4):35-42.

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

Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ, Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. Lasers Surg Med. 1997;20(1):56-63.

APÊNDICE A

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 / yasmim@fodjce.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