PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Odontologia

Alessandra Raid Carneiro

EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS NO LIGAMENTO PERIODONTAL SUBMETIDO À FORÇA ORTODÔNTICA

Belo Horizonte
2015

Alessandra Raid Carneiro

EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS NO LIGAMENTO PERIODONTAL SUBMETIDO À FORÇA ORTODÔNTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Ortodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ildeu Andrade Jr.
Coorientador: Prof. Me. José Maurício de Barros Vieira

Belo Horizonte
2015

FICHA CATALOGRÁFICA
Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Carneiro, Alessandra Raid
C289e Efeitos do laser de baixa intensidade na expressão de quimiocinas no ligamento periodontal submetido à força ortodôntica / Alessandra Raid Carneiro. Belo Horizonte, 2015.

73 f. : il.

Orientador: Ildeu Andrade Júnior.
Coorientador: José Maurício de Barros Vieira
Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Terapia a laser de baixa intensidade. 2. Movimentação dentária. 3. Remodelação óssea. 4. Quimiocinas. I. Andrade Júnior, Ildeu. II. Vieira, José Maurício de Barros. III. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

SIB PUC MINAS

CDU 616.314-089.23

Alessandra Raid Carneiro

EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS NO LIGAMENTO PERIODONTAL SUBMETIDO À FORÇA ORTODÔNTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Ortodontia.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:

1- Prof. Dr. Ricardo Alves de Mesquita – UFMG
2- Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares – PUC Minas
3- Prof. Dr. Ildeu Andrade Júnior – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 19 de novembro de 2015

A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Belo Horizonte, 12 de fevereiro de 2016

Prof. Dr. Ildeu Andrade Júnior
Orientador

Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Odontologia

Aos meus pais, Josemar e Elisabete, por tudo
que fazem e fizeram por mim ao longo
desses meus 26 anos de idade.

AGRADECIMENTOS

São poucas as formas na vida em que podemos de forma explícita, demonstrar a gratidão que temos a alguém. Vejo, através da minha defesa de dissertação de mestrado, uma oportunidade impar de poder agradecer aos meus pais tudo que eu vivi até hoje. Obrigada pelo carinho, apoio, dedicação, educação, amizade e amor. Sei que sempre que necessário abdicam de tudo pelos filhos e saber reconhecer e agradecer é o mínimo que posso fazer a vocês. Todo esse meu esforço e dedicação para chegar aonde cheguei eu devo a vocês e, portanto, os dedico mais essa conquista. Amo vocês.

Ao meu pai, Josemar Carneiro, obrigada por sempre fazer de tudo, tudo mesmo por nós. Mesmo com seu jeito de não demonstrar, mais tímido e introspectivo, é impossível não reconhecer que você faz tudo pela nossa família. Obrigada por ter me proporcionado todas as minhas conquistas acadêmicas, toda a minha educação.

À minha mãe, Elisabete Raid, minha melhor e maior amiga. A pessoa que eu conto pra tudo. Sei que sempre que precisar ela estará comigo. Minha maior incentivadora. Obrigada mãe por sempre ter se dedicado à nossa família, fazendo de tudo para que nós tivéssemos a melhor criação, para que nos tornássemos pessoas de caráter e que pudéssemos caminhar sozinhos sabendo discernir o que é certo ao que é errado.

Aos meus irmãos, Fabiano e Fernanda Raid, obrigada por serem, de alguma forma, exemplos para mim. Como irmãos mais velhos, sempre serviram como referência de que a responsabilidade e os estudos deveriam ter uma grande prioridade.

Ao meu namorado, Guilherme Parentoni, agradeço imensamente por toda a paciência, compreensão, carinho e amor durante esse período de reta final. Você fez parte desse processo e me ajudou diretamente e indiretamente com tudo que precisei.

Aos parentes e amigos agradeço pelos momentos em que pude mudar de foco e distrair, reunindo forças para voltar ao nosso dia-a-dia puxado.

Aos meus amigos e agora colegas de profissão da turma XV, Gabriel Oliveira, Juliana Mattos, Marcela Macedo, Márcia Xavier, Mariana Barros e Patrícia Costa, obrigada por terem feito essa jornada mais leve. Não poderia ter tido a sorte de ter uma turma melhor. Fomos companheiros e amigos do início ao fim com muita cumplicidade e um sempre ajudando o outro. Em especial, agradeço ao Gabriel pela parceria e a Juliana por ter sido minha companheira.

Aos amigos da turma XIV e XVI pelo companheirismo do dia-a-dia.

Ao meu orientador, Ildeu Andrade Jr., agradeço imensamente toda à ajuda, paciência, compreensão e confiança. Você foi o orientador que eu precisava. Obrigada ainda pelo carinho ao me mandar um email com a música do Roberto Carlos, me dando forças quando precisei e pelas palavras de incentivo.

Ao professor Paulo Alencar, agradeço muito toda a ajuda que o senhor me deu, mesmo não sendo meu coorientador oficial. Sem o senhor, sua ajuda e seus ensinamentos, essa pesquisa não teria sido concluída e então digo, com sinceridade, que o considero como tal.

Ao meu coorientador, José Maurício Vieira, agradeço por ter me proporcionado a chance de estar concluindo esse curso. Foi através do seu incentivo e orientação que tive o conhecimento e interesse de cursar o COP e não poderia ter feito uma escolha melhor. Obrigada ainda pela oportunidade que o senhor me deu de aprender Ortodontia através de seu trabalho. Foi uma experiência ótima.

Aos professores Rodrigo Soares e Martinho Campolina pela colaboração e carinho em nos ajudar a tornar essa pesquisa uma realidade.

Ao pessoal da UFMG, Tarcília Silva, Natália Rocha e Davidson Frois, pela grande ajuda com o processamento e análise de nossas amostras.

Às alunas Moara Martins e Renata Lima que me ajudaram e fizeram companhia. Vocês foram muito importantes para que eu tivesse animo em continuar.

Agradeço aos meus professores Armando Lima e Heloísio Leite pelo carinho, sentia isso em cada conversa. Flávio Almeida e José Eymard pelos grandes ensinamentos, com paciência durante a clínica. Bernardo Souki, Dauro Oliveira, Hélio Brito e Tarcísio Junqueira por saberem transmitir seus conhecimentos brilhantemente. Obrigada por todas as excelentes aulas. Ao Dauro, ainda, pelos elogios que me incentivavam a acreditar que toda a minha dedicação não estava sendo em vão e à Mariele Pantuzo por sempre estar disposta a ajudar. A todos os professores, de forma geral, agradeço pelos ensinamentos diários e exemplo de profissionalismo.

Aos funcionários da PUC Minas, agradeço por permitirem que o nosso dia-a-dia acontecesse de forma mais leve e organizada.

Aos pacientes, obrigada pela oportunidade de permitir que nosso aprendizado fosse possível.

E, por fim, agradeço a Deus, meu grande companheiro e protetor. Obrigada por sempre me dar força e perseverança para nunca desistir. Em todos os momentos de desanimo, o senhor me mostrou que eu estava no caminho certo e me animou a continuar. Obrigada pela minha fé e por mais essa conquista.

“Todos os seus sonhos podem se tornar realidade, se você tiver a coragem de ir atrás deles. Decidi não esperar as oportunidades e sim, buscá-las. Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz” (WALT DISNEY).

RESUMO

Nas últimas décadas, tem se observado o aumento do número de pacientes adultos em tratamento ortodôntico, o que vem estimulando a pesquisa por tratamentos mais eficazes, com maior conforto e menor duração. Diversos mecanismos têm sido estudados para se alcançar estes objetivos, principalmente a aceleração do movimento dentário ortodôntico (MDO) e, entre eles, está à utilização do laser terapêutico de baixa intensidade (LBI). No entanto, a literatura carece de estudos que avaliem os efeitos moleculares do LBI na remodelação óssea induzida por força ortodôntica. Durante a MDO, diversos tipos celulares são recrutados para o sítio periodontal e mediadores inflamatórios, como as quimiocinas, desempenham papel importante nesse recrutamento e ativação celulares. Assim sendo, o objetivo desse estudo preliminar foi avaliar os efeitos da aplicação do LBI na expressão das quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10 no ligamento periodontal (LP) de pré-molares (PM) submetidos à MDO. Para isso, 15 pacientes com indicação ortodôntica de exodontia dos PM (24 arcadas, 48 PM) foram submetidos a um sistema de boca dividida, onde o LBI (100 Mw, 8J, 80 segundos em cada dente) foi aplicado no processo alveolar vestibular e palatino/lingual dos PM de apenas um lado e o lado contralateral (sem aplicação do LBI) foi o controle. Os pacientes foram divididos em três grupos: Grupo 1 (G1) - sem aplicação de força, com exodontia 24 horas após LBI; Grupo 2 (G2) - aplicação de força ortodôntica intrusiva de 0.98 N imediatamente antes do LBI, com exodontia após 24 horas e Grupo 3 (G3) - aplicação de força ortodôntica intrusiva de 0.98 N imediatamente antes do LBI, nova aplicação de LBI depois de 7 dias e exodontia após 14 dias. O LP dos dentes extraídos foi coletado para quantificação das quimiocinas por meio de *Cytometric Bead Array* (CBA). Nos LP não submetidos à força ortodôntica (G1), o LBI não alterou de forma significativa a expressão das quimiocinas avaliadas. O mesmo foi observado nos LP submetidos à força ortodôntica, tanto após 24 horas (G2), quanto após 14 dias (G3). Nossos dados sugerem que o LBI na quantidade e tempo utilizado não foi capaz de afetar a expressão das quimiocinas avaliadas no LP submetido ou não à aplicação de força ortodôntica intrusiva. Novos estudos são necessários para determinar os melhores protocolos do LBI, bem como sua influência na expressão de outros mediadores envolvidos nos processos biológicos relacionados ao MDO.

Palavras-chave: Laser. Movimentação dentária ortodôntica. Remodelação óssea.

ABSTRACT

In the last decades, the increasing number of adult patients seeking orthodontic treatment has stimulated the research for more effective treatments that provides greater comfort to the patient and reduces the treatment time. Several mechanisms have been studied to achieve these objectives, mainly the acceleration of the orthodontic tooth movement (OTM), such as the use of Low-Level Laser Therapy (LLLT). However, there is a lack of studies that evaluates the molecular effects of LLLT in bone remodeling induced by orthodontic force. During OTM, several cell types are recruited to the periodontal site and inflammatory mediators, such as the chemokines, play an important role in the recruitment and activation of bone cells. Therefore, the aim of this preliminary study was to evaluate the effects of LLLT in the expression of the chemokines CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 and CXCL10 in the periodontal ligament (PDL) of premolars (PM) submitted to mechanical loading. 15 patients with orthodontic indication of PM extractions (24 arches, 48 (PM)) were evaluated in a split-mouth design where the LLLT (100 mW, 8J, 80 seconds for each tooth) was applied in the PM alveolar process (buccal and palatal/lingual) in the experimental side and the contralateral side (without LLLT application) was used as control. The patients were divided into three groups: Group 1 (G1) - without application of orthodontic force, with extraction 24 hours after LLLT; Group 2 (G2) - application of an intrusive orthodontic force of 0.98 N just before LLLT, with extraction after 24 hours and Group 3 (G3) - application of an intrusive orthodontic force of 0.98 N just before the LLLT, a second LLLT application after 7 days and with extraction after 14 days. The periodontal ligaments of the extracted teeth were collected to analyze the chemokine expression by Cytometric Bead Array (CBA). The results showed that LLLT made no significant changes in the levels of the chemokines analized in the PDL without orthodontic force (G1). The same result was found in the PDL after application of orthodontic force, after 24 hours (G2) and after 14 days (G3). Our data suggest that the LLLT, with the above protocol of energy dose, power and time of application, was not capable of affecting the expression of chemokines in the PDL submitted or not to an intrusive orthodontic force. Further studies are needed to determine the best LLLT protocols, as well as its influence on the expression of other mediators involved in the biology of the OTM.

Keywords: Laser. Orthodontic tooth movement. Bone remodeling.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBA - *Cytometric bead array*

CCL - Quimiocina CC ligante

CCR - Receptor de Quimiocina CC

CEP - Comitê de ética em pesquisa

CXCL8 - Quimiocina CXC ligante 8

CXCL9 - Quimiocina CXC ligante 9

CXCL10 - Quimiocina CXC ligante 10

G1 - Grupo 1

G2 - Grupo 2

G3 - Grupo 3

IL-8 - Interleucina-8 (CXCL8)

IP-10 - *Human interferon-inducible protein 10* (CXCL10)

LASER - *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*

LBI - Laser Terapêutico de Baixa Intensidade - *Low Level Laser Therapy*

LP - Ligamento periodontal

MCP-1 - Proteína quimiotática para monócitos-1 (CCL2 - quimiocina CC ligante 2)

MDO - Movimentação dentária ortodôntica

MIG - *Monokine induced by gamma interferon* (CXCL9)

M-CSF- Fator estimulante de colônias de macrófagos

N – Newton

OPG – Osteoprotegerina

PM - Pré-molar

PUC Minas– Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

RANK - *Receptor activator of NFkB* / Receptor ativador do fator nuclear kappa B

RANKL - *Receptor activator of NFkB ligand* / Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B

RANTES - *Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted* (CCL5 - quimiocina CC ligante 5)

TMA - Titânio Molibdênio

TNF – Fator de necrose tumoral

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Remodelação óssea. 26

Figura 2. Principais eventos da osteoclastogênese durante a remodelação óssea. 27

Figura 3. Representação esquemática da função e diferenciação osteoclástica regulada por osteoblastos..... 28

Figura 4. Aparelho ortodôntico com a mola de intrusão ativada..... 34

Figura 5. Mensuração da ativação do cantilever com dinamômetro digital. 35

Figura 6. Aplicação do LBI. (A) Rebordo alveolar inferior vestibular. (B) Rebordo alveolar palatino. 37

Figura 7. Laser MM Optics. 37

Figura 8. (A) Dente logo após a exodontia. (B) LP curetado sendo armazenado. 38

Figura 9. (A) Tecido homogeneizado. (B) Tecido após centrifugação. 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Desenho do estudo. 36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **25**

2 OBJETIVOS **31**
2.1 Objetivo geral **31**
2.2. Objetivos específicos **31**

3 MATERIAL E MÉTODOS **33**
3.1 Características do estudo **33**
3.2 Processo ético **33**
3.3 Amostra **33**
3.4 Avaliação higiene oral **34**
3.5 Protocolo clínico ortodôntico **34**
3.5.1 Delineamento experimental ***35***
3.6 Protocolo Laser **36**
3.7 Protocolo de exodontia e coleta do LP **37**
3.8 Quantificação da expressão das quimiocinas **38**
3.8.1 Processamento do LP ***38***
3.8.2 Análise das quimiocinas por CBA ***39***

4 ARTIGO CIENTÍFICO **41**

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS **55**

REFERÊNCIAS **57**

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido **61**

ANEXO B - Termo de Assentimento **65**

ANEXO C - Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/PUC MINAS) **69**

ANEXO D - Cartilha Sobre Orientação de Escovação **73**

1 INTRODUÇÃO

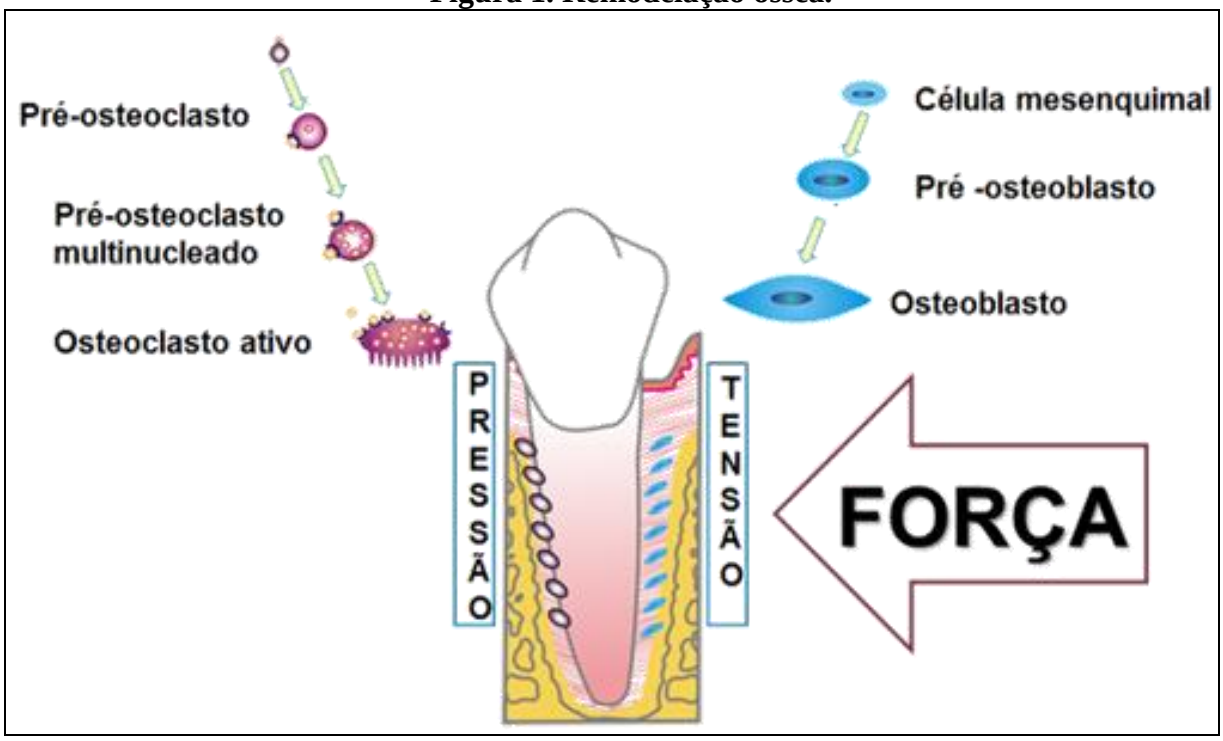
O extenso tempo de tratamento é uma das principais queixas dos pacientes submetidos ao tratamento ortodôntico nos dias atuais e, para que haja uma redução desse tempo, é necessária a aceleração da movimentação dentária ortodôntica (MDO). Existe na literatura a comprovação de diversos mecanismos que aumentam a taxa de MDO, como a corticotomia, o uso de vibradores e a injeção local de mediadores inflamatórios como a prostaglandina (YAMASAKI et al., 1984; SEIFI; ESLAMI; SAFFAR, 2003), a vitamina D3 ativa (COLLINS; SINCLAIR, 1988) e a osteocalcina (HASHIMOTO et al., 2001). No entanto, a maioria desses mecanismos é invasiva, gerando dor e desconforto aos pacientes, o que pode desfavorecer sua aplicabilidade clínica.

Um mecanismo não invasivo que tem sido discutido na literatura sobre seus benefícios em acelerar a regeneração óssea é o Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation)* (SAITO; SHIMIZU, 1997; DOSHI-MEHTA; BHAD-PATIL, 2012), o que tem contribuído para torná-lo cada vez mais frequente na clínica odontológica, por produzir inúmeros benefícios aos pacientes nas diversas especialidades. Os Lasers são radiações que se encontram no espectro de luz que varia do infravermelho ao ultravioleta, passando pelo espectro visível. Eles são classificados como Lasers de baixa e alta intensidade, sendo diferenciados principalmente pela potência e mecanismo de ação (NEVES et al., 2005). Os Lasers de alta potência agem por aumento da temperatura, sendo normalmente utilizados em procedimentos cirúrgicos. Já os Lasers de baixa intensidade (LBI) não apresentam potencial destrutivo e estimulam o metabolismo celular, sendo este o mecanismo de maior interesse na Ortodontia (LOEVSCHALL; ARENHOLT-BINDSLEV, 1994).

A MDO é caracterizada por alterações dos tecidos dentais e paradentais que, quando expostos a diferentes graus de magnitude, frequência e duração da carga mecânica, expressam profundas alterações macroscópicas e microscópicas. Diferentemente da movimentação fisiológica que se caracteriza por ser um processo lento, a MDO pode ocorrer rapidamente, dependendo das características físicas da força aplicada e da resposta biológica do ligamento periodontal (LP), criando regiões de compressão e tensão que são os mecanismos chaves da remodelação óssea (REITAN, 1960).

A remodelação óssea é um processo constante, que envolve o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea realizada por células especializadas: osteoblastos nas áreas de tensão e osteoclastos nas áreas de pressão (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006; MEIKLE, 2006) (Fig. 1).

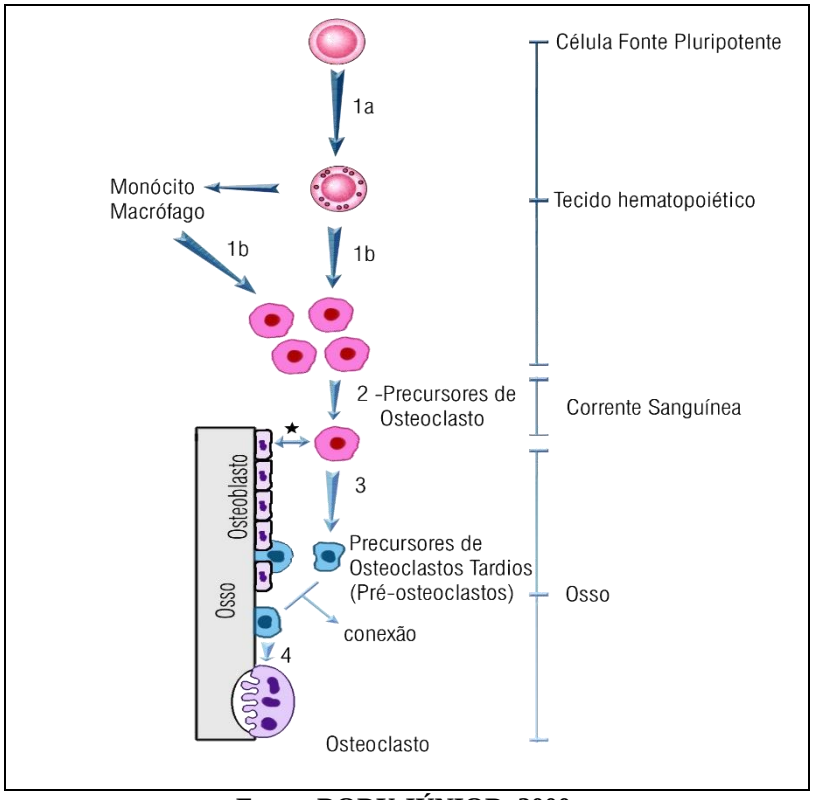
Figura 1. Remodelação óssea.



Fonte: Elaborado pela autora.

As interações entre estas células podem regular a reabsorção óssea através de dois processos: (1) efeito no número de osteoclastos em uma localidade e/ou (2) efeito no nível de atividade de reabsorção óssea do osteoclasto (ROODMAN, 1991). Quando o osso é estimulado a reabsorver, uma cascata de eventos é iniciada para recrutar e manter os osteoclastos nos locais específicos durante a remodelação óssea. O processo de formação de osteoclastos é realizado em uma sequência de eventos complexos que podem ser descritos assim: (1a) divisão das células tronco; (1b) proliferação das células progenitoras de osteoclastos em tecidos hematopoiéticos; (2) migração das células precursoras de osteoclastos para os locais de reabsorção óssea; (3) diferenciação das células precursoras em pré-osteoclastos; (4) fusão em osteoclastos maduros e anexação à superfície de matriz óssea e (*) interação entre os osteoclastos e os osteoblastos (Fig. 2).

Figura 2. Principais eventos da osteoclastogênese durante a remodelação óssea.

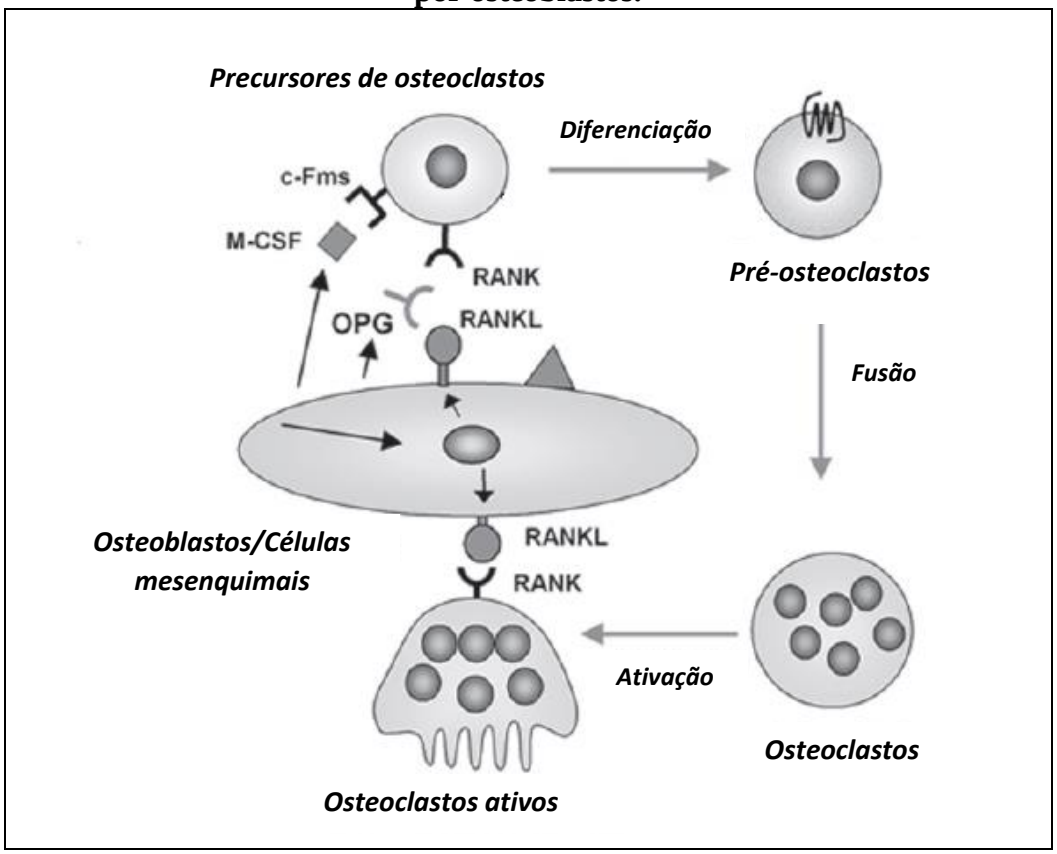


Fonte: RODY JÚNIOR, 2000.

Quando as células precursoras chegam aos sítios de remodelação, elas sofrem uma série de alterações ultraestruturais guiadas pela interação celular com os osteoblastos (RODY; KING; GU, 2001). A descoberta de novos membros da família do fator de necrose tumoral (TNF) tem elucidado o mecanismo pelo qual osteoblastos regulam a diferenciação e a função dos osteoclastos. Os osteoblastos expressam um membro da família do TNF, chamado ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL). As células precursoras de osteoclastos, em resposta a ativação de seu receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK), outro membro da família do TNF, por seu ligante RANKL, através de uma interação com as células osteoblásticas, se diferenciam em pré-osteoclastos na presença do fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) (TAKAHASHI; UDAGAWA; SUDA, 1999). M-CSF, que é imperativo para a maturação osteoclástica, se une ao seu receptor tirosina-quinase (c-Fms), nas células precursoras de osteoclastos, fornecendo sinais necessários para sua sobrevivência e proliferação (TEITELBAUM; ROSS, 2003). No entanto, alem do RANKL, os osteoblastos expressam ainda a osteoprotegerina (OPG), que regula negativamente a osteoclastogênese. Ela inibe fortemente a reabsorção óssea por se unir com alta afinidade ao seu ligante RANKL, impedindo a interação RANK-RANKL e também por

provocar uma aceleração da apoptose de osteoclastos maduros (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003) (Fig. 3).

Figura 3. Representação esquemática da função e diferenciação osteoclástica regulada por osteoblastos.



Fonte: **KOBAYASHI; UDAGAWA; TAKAHASHI, 2009.**

A regulação do desenvolvimento dos osteoclastos é realizada por várias substâncias como hormônios, citocinas, fatores de crescimento e constituintes da matriz óssea. As citocinas são proteínas de sinalização extracelular que agem entre as células do sistema imune, regulando este sistema. Elas são secretadas após a ativação de uma determinada célula do sistema imune e a secreção é de curta duração, geralmente variando de poucas horas a poucos dias. A maioria das citocinas tem ação em curta distância, e estas são produzidas por uma variedade de células e unem-se a receptores presentes em numerosos tipos celulares. As citocinas são pleiotrópicas, pois uma mesma citocina pode agir em vários tipos celulares; redundantes, já que diferentes citocinas podem realizar a mesma função; e multifuncionais, pelo fato de uma mesma citocina ser capaz de regular várias funções diferentes (LEE; LORENZO, 2006). Algumas citocinas podem ser, ainda, antagonistas, quando uma estimula uma função enquanto outra inibe esta mesma função. Outras podem ser sinergísticas, quando em combinação com outra, potencializam os seus efeitos individuais (DAVIDOVITCH et al.,

1988). Elas podem modificar as células que as produzem (efeito autócrino), alterar outras células próximas (efeito parácrino), ou ainda, afetar células distantes do sítio de produção (efeito endócrino). Portanto, as citocinas desempenham um papel importante na comunicação intercelular e podem afetar o metabolismo ósseo, seja no recrutamento, na maturação, na ativação e/ou na sobrevivência de precursores de osteoclastos provenientes da circulação e assim, consequentemente, influenciar a MDO (YAO et al., 2008).

Como parte da família das citocinas, as quimiocinas atuam como potentes mediadores ou reguladores da inflamação e, nos tecidos ósseos, têm papel chave no transporte, diferenciação e ativação de células (ANDRADE JR. et al., 2007; TADDEI et al., 2012). Elas são divididas em quatro subfamílias baseadas em critério estrutural, funcional e genético, sendo duas dessas subfamílias as quimiocinas CC (subfamília β) e as quimiocinas CXC (subfamília α) (TAUB et al., 1993).

As quimiocina CC ligante 2 (CCL2/MCP-1), CC ligante 5 (CCL5/RANTES), CXC ligante 8 (CXCL8/IL-8), CXC ligante 9 (CXCL9/MIG) e CXC ligante 10 (CXCL10/IP-10)] estão envolvidas no processo inflamatório e atuam direta ou indiretamente na atividade osteoclástica (SAITO et al., 1990; ALHASHIMI et al., 1999; GRAVES; JIANG; VALENTE, 1999; VOLEJNIKOVA; MARKS; GRAVES, 2002).

As quimiocinas CCL2 e CCL5 promovem quimiotaxia de osteoclastos quando se ligam aos seus respectivos receptores CCR2 e CCR5, expressos por precursores de osteoclastos, promovendo sua diferenciação e, portanto, estimulando a atividade osteoclástica. Especificamente, CCL2 atua na quimioatração, diferenciação e ativação de osteoclastos e é expressa por uma variedade de tipos celulares tais como, osteoblastos, osteoclastos, células endoteliais e epiteliais, fibroblastos e monócitos (LEONARD; YOSHIMURA, 1990; RAHIMI et al., 1995; YU; GRAVES, 1995; YADAV; SAINI; ARORA, 2010). Já CCL5, quando ligada ao seu receptor, promove a proliferação, atividade e sobrevida dos osteoclastos (ANDRADE JR. et al., 2007; TADDEI et al., 2012). Além disso, ela exerce um importante papel quimioatrativo de várias células inflamatórias, tais como monócitos e eosinófilos (CHIHARA, 1998). RANKL induz ainda a produção de CCL2 e CCL5 por osteoclastos, o que sugere uma sinalização autócrina e parácrina durante a osteoclastogênese (ANDRADE JR.; TADDEI; SOUZA, 2012).

A CXCL8 é considerada um dos mais potentes fatores de quimioatração de neutrófilos na inflamação (HOFFMANN et al., 2002) e estimula diretamente a diferenciação de células mononucleares da medula óssea em osteoclastos (LU et al., 2007). Ela é produzida pelas células epiteliais, macrófagos e linfócitos T e participa na regulação da reabsorção do osso

alveolar durante o movimento dentário, agindo nos estágios iniciais da resposta inflamatória (TUNCER et al., 2005).

A CXCL9 é uma pequena citocina, também conhecida como *monokine induced by gamma interferon* (MIG) e está intimamente relacionada com outras duas quimiocinas, conhecidas como CXCL10 e CXCL11. Sua produção é induzida por interferon-gama (IFN-γ) e atua recrutando leucócitos para os sítios de infecção e inflamação (MÜLLER et al., 2010).

A CXCL10, também conhecida como *human interferon-inducible protein 10* (IP-10), é secretada principalmente por monócitos, fibroblastos e células endoteliais (DUFOUR et al., 2002) e atrai quimicamente monócitos e células T (ANGIOLILLO et al., 1995).

O conhecimento de todos esses mecanismos moleculares envolvidos na remodelação óssea é essencial para a compreensão dos procedimentos realizados diariamente na clínica odontológica para a aceleração da MDO. Diversos estudos avaliando a MDO sugeriram que o tecido ósseo submetido à LBI apresenta um processo de reparação acelerada, com aumento da remodelação óssea e, consequentemente, da velocidade do MDO (KAWASAKI; SHIMIZU, 2000; GOULART et al., 2006). Entretanto, apesar de alguns estudos em animais (KHADRA et al., 2004; YOSHIDA et al., 2009; ALTAN et al., 2012), poucos trabalhos com LBI demonstraram uma aceleração significativa da MDO em humanos (CRUZ et al., 2004; LIMPANICHKUL et al., 2006; YOUSSEF et al., 2008; SOUSA et al., 2011; DOSHI-MEHTA; BHAD-PATIL, 2012; GENC et al., 2013), e nestes, não foram avaliadosos efeitos do LBI nos mecanismos moleculares envolvidos no processo de MDO.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do LBI na expressão de quimiocinas em células do LP de pré-molares (PM) submetidos ou não à força ortodôntica intrusiva.

2.2. Objetivos específicos

a) avaliar os efeitos do LBI na expressão das quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10 no LP de pré-molares;
b) avaliar os efeitos do LBI na expressão das quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10 no LP de pré-molares submetidos à força de intrusão, em diferentes tempos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Características do estudo

Esse estudo preliminar, ensaio clínico, controlado, em um sistema de boca dividida e randomizado, foi realizado em pacientes com indicação de tratamento ortodôntico na clínica de Ortodontia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas) e realizado em parceria com o Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.2 Processo ético

Todos os participantes e responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e/ou Termo de Assentimento (ANEXOS A e B) e o protocolo da pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da PUC Minas, Belo Horizonte, Brasil (CAAE: 29333414.9.0000.5137) (ANEXO C).

3.3 Amostra

A amostra consistiu de 15 pacientes saudáveis, de ambos os sexos (oito do gênero masculino e sete do gênero feminino), cuja média de idade foi de 14,3 anos ± 2,5 e que necessitavam de exodontia de primeiros pré-molares bilaterais maxilares e/ ou mandibulares (24 arcadas, 48 PM), como parte do tratamento ortodôntico. O diagnóstico e plano de tratamento de cada paciente foi conduzido após análise da documentação ortodôntica, constituída de fotografias intra e extraorais, modelos de gesso, radiografias panorâmicas, periapicais e telerradiografias.

Os seguintes critérios de inclusão foram utilizados: convexidade facial, protrusão/biprotrusão dos incisivos, apinhamento dentário, condição periodontal saudável e higiene bucal satisfatória. Foram excluídos pacientes em uso de medicamentos que poderiam interferir no metabolismo ósseo, tais como anti-inflamatórios, antibióticos e suplementos hormonais, evidencia radiográfica de perda óssea periodontal, hábitos parafuncionais e/ou interferência oclusal. Os pacientes foram orientados em relação aos riscos e benefícios da pesquisa.

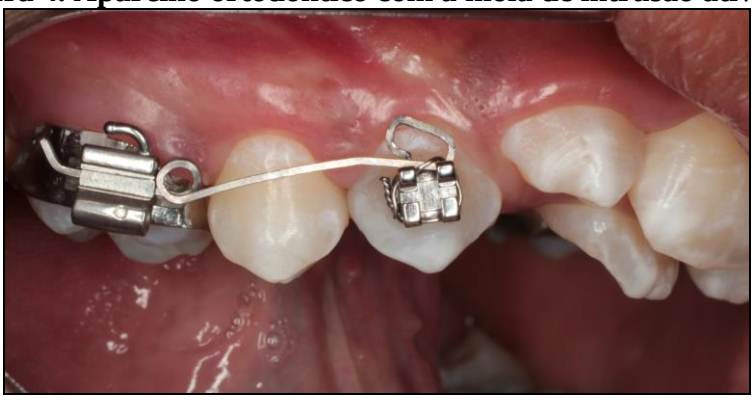
3.4 Avaliação higiene oral

Todos os pacientes foram submetidos à profilaxia supragengival previamente ao início do estudo, orientados verbalmente e através de uma cartilha sobre higiene oral (ANEXO D) e receberam escova de dente como forma de motivar a escovação dentária.

3.5 Protocolo clínico ortodôntico

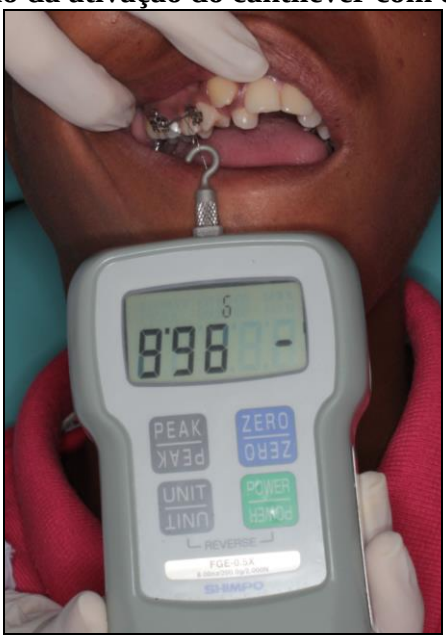
A mecânica ortodôntica utilizada foi baseada em um estudo prévio (MADUREIRA et al., 2012). Separadores foram colocados na mesial e distal dos primeiros molares, para a instalação de bandas ortodônticas (American Orthodontics, Sheboygan, EUA) soldadas com tubo edgewise straightwire (American Orthodontics, Sheboygan, EUA) e cimentadas nos primeiros molares de todos os pacientes. Braquetes edgewsise standart (American Orthodontics, Sheboygan, EUA) foram colados com resina Transbond (3M Unitek, California, EUA) nos primeiros pré-molares dos pacientes que receberam força ortodôntica através de um cantilever de titânio molibdênio (TMA) 0.017 x 0.025” (Ormco, Amersfoort, Holanda). O cantilever foi conectado aos braquetes através de amarrilho 0.10” (Morelli, Sorocaba, Brasil) (Fig. 4) e a força ortodôntica de 0.98 N em direção apical foi mensurada por meio de um dinamômetro digital de tração e compressão (modelo FGV-1X, Nidec-Shimpo, Itasca, III, EUA) (Fig. 5).

Figura 4. Aparelho ortodôntico com a mola de intrusão ativada.



Fonte: Foto da autora.

Figura 5. Mensuração da ativação do cantilever com dinamômetro digital.



Fonte: Foto da autora.

3.5.1 Delineamento experimental

Os pacientes foram divididos em três grupos, cada um composto por 8 arcadas (4 maxilas e 4 mandíbulas - 16PM): Grupo 1 (G1): Pacientes sem MDO. No primeiro dia receberam aplicação do LBI e retornaram à clínica 24 horas após, para que os PM fossem extraídos; Grupo 2 (G2): No primeiro dia foi realizada a colagem dos braquetes nos PM a serem extraídos, confecção e ativação do cantilever de intrusão e aplicação do Laser. Da mesma maneira, o paciente retornou após 24 horas para a exodontia; Grupo 3 (G3): Os pacientes receberam os mesmos procedimentos dos pacientes do grupo G2, porém em tempos distintos. O seu primeiro retorno aconteceu sete dias após a colocação do aparelho ortodôntico, onde uma nova aplicação do LBI foi realizada. O paciente retornou à clínica sete dias após este procedimento (14 dias após ativação do cantilever) e as exodontias foram realizadas (Tabela 1).

Tabela 1. Desenho do estudo.

Grupos	Força	Tempos		N	Gênero	Idade* (anos)
		Laser (Dias)	Extração			
G1	Não	0	24 horas	8	6M, 2F	14.13 ± 2.47
G2	Sim	0	24 horas	8	6M, 2F	13.88 ± 2.30
G3	Sim	0; 7	14 dias	8	2M, 6F	14.88 ± 3.40
Total				24	14M, 10F	14.3 ± 2.5

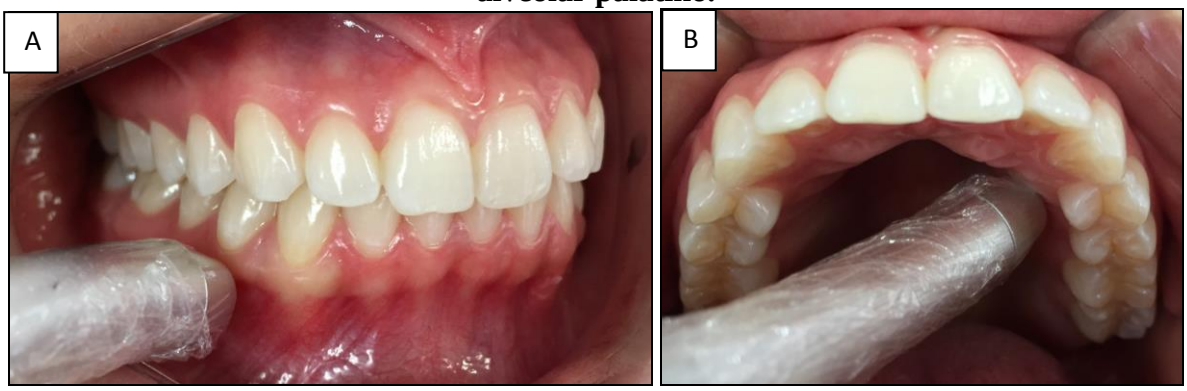
Valores de média +/- DP, desvio padrão*; $p > 0.05$.
M, Masculino; F, Feminino; N, número de pares de dentes

Fonte: Elaborado pela autora.

3.6 Protocolo Laser

Em cada paciente, os quadrantes direito e esquerdo foram divididos de forma randomizada em lado experimental (recebeu LBI) e lado controle (sem LBI). A aplicação do LBI foi realizada na região de rebordo alveolar do pré-molar pela face vestibular, durante 40 segundos e pela face lingual/palatina por mais 40 segundos para cobrir as fibras periodontais e o processo alveolar em torno dos PM (Figs. 6A e 6B). O Laser utilizado foi semicondutor diodo (Arsenieto de Gálio e Alumínio - GaAlAs), previamente calibrado, emitindo radiação infravermelha, com comprimento de onda de 808 nm, potência de saída de 100 mW, distribuída através de uma ponta convencional de 3 mm^2 de diâmetro, sempre mantida em contato com a mucosa suprajacente durante a aplicação e operado de acordo com as orientações do fabricante (TF Premier, MM Optics Ltda., São Carlos, Brasil) (Fig. 7). A dose foi de 133 J/cm^2 e a densidade de energia total em cada aplicação foi de 8 J (4 J por vestibular e 4 J por lingual/palatina). Óculos de proteção foram usados tanto pelo operador quanto pelo o paciente. As aplicações do LBI foram sempre efetuadas por um mesmo operador para evitar variações interoperador.

Figura 6. Aplicação do LBI. (A) Rebordo alveolar inferior vestibular. (B) Rebordo alveolar palatino.



Fonte: Fotos da autora.

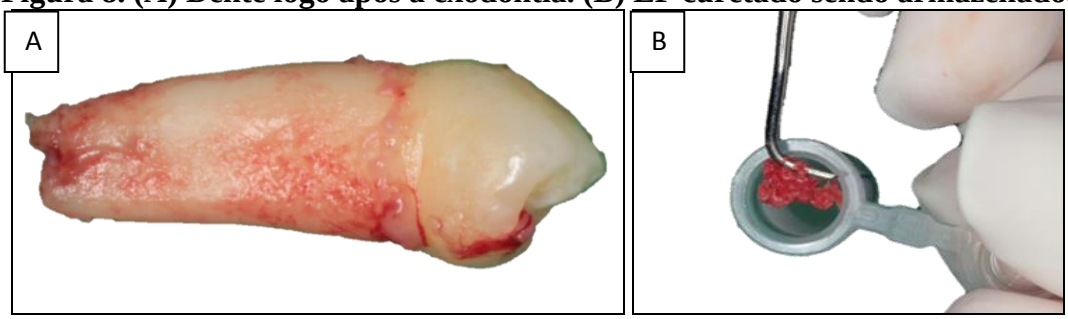
Figura 7. Laser MM Optics.

Fonte: Foto da autora.

3.7 Protocolo de exodontia e coleta do LP

As exodontias foram realizadas pelo mesmo cirurgião-dentista por meio de técnica atraumática. Imediatamente após extração, todo o LP aderido às raízes dos dentes foi raspado com auxílio de cureta periodontal (Golgran, São Paulo, Brasil) (Fig. 8A). Todo o material coletado foi colocado em tubos plásticos de 1,5mL e armazenado em freezer -80°C para posterior análise (Fig. 8B).

Figura 8. (A) Dente logo após a exodontia. (B) LP curetado sendo armazenado.



Fonte: Fotos da autora.

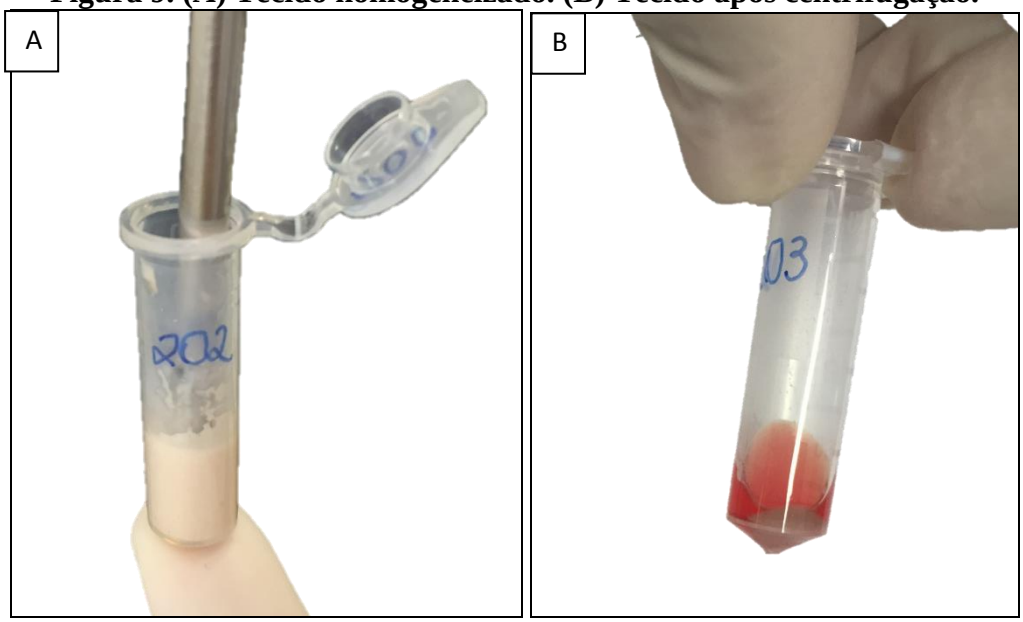
3.8 Quantificação da expressão das quimiocinas

3.8.1 Processamento do LP

Inicialmente, os tubos contendo as amostras de ligamento periodontal foram pesados e a média do peso foi de 23,79 mg (± 9.6) nos elementos controle e 23,92 mg (± 9.24) para os dentes sob aplicação de Laser. Para o *Cytometric Bead Array* (CBA) foi feita a normalização de acordo com a massa de LP de cada amostra.

Para cada 100 mg de tecido, foi adicionado 1 mililitro (ml) de solução de extração de citocinas [PBS (0,4 mM NaCl, 10 mM NaPO4) com inibidores de proteases (0,1 mM PMSF, 0,1 mM Benzethonium clorídrico, 10 mM EDTA e 0,01 mg/mL Aprotinina A, pH 7.4) e Tween 20 (0,05%)] e homogeneizados utilizando-se de um triturador de tecidos (PowerGen 100, Fisher Scientific) (Fig. 9A). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM por 10 minutos, 4ºC. O sobrenadante foi separado (Fig. 9B) e uma nova diluição foi realizada com a mesma quantidade de solução de extração de citocinas previamente adicionada (diluição final 1:2). Foram utilizados 50 µL do sobrenadante para análise de citocinas por CBA.

Figura 9. (A) Tecido homogeneizado. (B) Tecido após centrifugação.



Fonte: Fotos da autora

3.8.2 Análise das quimiocinas por CBA

Para quantificação das quimiocinas, utilizamos o *CBA Human Chemokine Kit* (BD Biosciences, San Diego, USA), que analisa simultaneamente os níveis de CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10. Sucintamente, microesferas de captura para cada quimiocina analisada foram misturadas no volume adequado ao número de amostras do experimento. Em seguida, 25 µL da solução contendo as microesferas de captura foram adicionados a cada poço da placa fundo em U. Foram adicionados 25 µL das amostras processadas de LP ou dos padrões (padrões liofilizados reconstituídos e preparados por diluição seriada), além de 25 µL do reagente de detecção PE, seguido de incubação por 3h à temperatura ambiente. Foram adicionados, então, 150 µL do tampão de lavagem a cada poço e a placa centrifugada a 200g, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido com 150 µL do tampão de lavagem. Finalmente, os padrões e amostras foram analisados em citômetro de fluxo (FACS Canto II, Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA). As quimiocinas foram quantificadas através do programa FCAP Array (Becton, Dickinson and Company). A concentração das quimiocinas analisadas foi determinada utilizando-se curva padrão, seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em picograma (pg) por 100 mg de tecido.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Effects of low intensity laser therapy in the expression of chemokines in the periodontal ligament under orthodontic force

Artigo a ser submetido ao American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics (Qualis A1), cujas normas para submissão de artigos podem ser visualizadas no endereço eletrônico: http://www.ajodo.org/authorinfo

Effects of low intensity laser therapy in the expression of chemokines in the periodontal ligament under orthodontic force

Alessandra Raid Carneiro, [a] José Maurício de Barros Vieira, [b] Natalia Pessoa Rocha, [c] Paulo Eduardo Alencar Souza, [d] Rodrigo Villamarim Soares, [e] Tarcília Aparecida da Silva, [f] Ildeu Andrade Junior [g]

[a] Orthodontic Resident, Graduate Program in Orthodontics, Faculty of Dentistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

[b] Associate Professor, Department of Orthodontics, Faculty of Dentistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

[c] Postdoctoral Fellow at the Interdisciplinary Laboratory of Medical Research, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

[d] Associate Professor, Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

[e] Associate Professor, Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

[f] Associate Professor, Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

[g] Associate Professor, Department of Orthodontics, Faculty of Dentistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding Author:

Ildeu Andrade Junior

Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas)

Graduate Program in Orthodontics

Address: Av. Dom José Gaspar, 500. Prédio 46, Sala 101 Belo Horizonte, MG, Brazil, 30535-901.

Phone: 55(31)3319-4414, Fax: 55(31)3319-4415

E-mail: ildeu_andrade@yahoo.com.br

ABSTRACT

Introduction: The aim of this preliminary study was to evaluate the effects of Low-Level Laser Therapy (LLLT) in the expression of chemokines CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 and CXCL10 during orthodontic tooth movement (OTM). **Methods:** Fifteen patients (24 arches, 48 premolars (PM)) were evaluated in a split-mouth design and the PM were subjected to an intrusive orthodontic force of 0.98 N. The patients were randomly divided into three different groups: Group 1 (G1) - without application of orthodontic force, and PM extraction 24 hours after LLLT; Group 2 (G2) - application of orthodontic force just before the LLLT, and PM extraction 24 hours after and Group 3 (G3) - application of orthodontic force just before the LLLT, another section of LLLT after 7 days and PM extraction after 14 days. The Laser (100 mW, 8J, 80 seconds for each tooth) was applied in the PM alveolar process (buccal and palatal/lingual) and the contralateral side (without LLLT application) was used as control. After PM extraction, the periodontal ligaments (PDL) were collected to analyze the chemokine expression by means of Cytometric Bead Array (CBA). **Results:** No significant changes in the chemokine levels were observed after 24 hours of LLLT application (G1). The same result was found after LLLT and application of orthodontic force (G2 and G3). **Conclusions:** This preliminar study suggests that LLLT did not increase the expression of these pro-inflammatory proteins, which are directly involved in the recruitment and activation of osteoclasts. Further studies are needed to determine the best LLLT protocols, using different time periods of analysis, as well as their influence in relation to other inflammatory mediators.

Keywords: Laser. Orthodontic tooth movement. Bone remodeling.

INTRODUCTION AND LITERATURE REVIEW

The extensive treatment time is one of the main concerns of orthodontists and patients, which has led to a search for new ways to accelerate the rate of orthodontic tooth movement (OTM). The literature shows that several mechanisms are used to speed up the rate of OTM, such as corticotomy, vibration and local injection of inflammatory mediators.[1,2] However, most of these mechanisms are invasive, can cause pain and discomfort to patients, which can be a clinical disadvantages.

The Low-Level Laser Therapy (LLLT), a non-invasive mechanism described in the literature as a potential way to accelerate bone regeneration and stimulate cell metabolism, has called attention in the orthodontic field.[3-5]

Although several studies have reported the influence of LLLT in the OTM, suggesting that bone tissue undergoing LLLT presents an accelerated repairing process, with increased rates of bone remodeling and, consequently, speeding up the OTM, the molecular mechanisms involved in this process have not been elucidated.[5-12]

The aim of this study was to evaluate the effects of LLLT in the expression of five chemokines involved in the inflammatory process caused by OTM, the chemokines CC ligant 2 (CCL2/MCP-1), CC ligant 5 (CCL5/RANTES), CXC ligant 8 (CXCL8/IL-8), CXC ligant 9 (CXCL9/MIG) and CXC ligant 10 (CXCL10/IP-10), which according to the literature, are directly or indirectly involved in the osteoclast recruitment, differentiation and activation.[4,13-15]

MATERIAL AND METHODS

Fifteen healthy patients (8 males, 7 females) aged 11 to 20 years (mean, 14.3 ± 2.5 years), 24 arches, 48 premolars (PM), who sought orthodontic treatment at the Department of Orthodontics in the Pontifical Catholic University of Minas Gerais (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), and required the extraction of the first maxillary and/or mandibular PM as part of the orthodontic treatment. The inclusion criteria were: (1) healthy patients in good periodontal condition; (2) no use of medications that could interfere with bone metabolism, such as anti-inflammatory, antibiotic and hormone supplements; (3) need of maxillary and/or mandibular premolar extraction before orthodontic treatment; (4) good periodontal health with no radiographic evidence of periodontal bone loss, parafunctional habits and/or occlusal interference. Patients and their parents were informed about the risks and benefits of research.

This study was approved by our institutional ethics committee (protocol number: 29333414.9.0000.5137) and all participants and guardians (for children under 18 years old)

signed an informed consent form. All patients underwent prophylaxis prior to the start of the study, were guided verbally and received a toothbrush as a way to motivate tooth brushing. The oral hygiene was observed throughout the experiment.

The orthodontic appliance in the experimental group consisted of orthodontic bands (American Orthodontics, Sheboygan, USA) welded to an edgewise straightwire tube, Roth prescription, (American Orthodontics, Sheboygan, USA) and cemented on the maxillary first molars of all patients. Edgewise standart brackets (American Orthodontics, Sheboygan, USA) were bonded with Transbond resin (3M Unitek, California, USA) in the first PM. An intrusion cantilever, made with a Titanium Molybdenum (TMA) arch wire 0.017 x 0.025-in (Ormco, Amersfoort, Netherlands), was used for mechanical loading. It was tied to the bracket with a 0.010-in metallic ligature (Morelli Orthodontics, Sorocaba, Brazil) (Figure 1) and the force was measured (0.98 N), perpendicular to the cantilever, using a digital dynamometer of tension and compression (FGV-1X model, Nidec-Shimpo, Itasca, Ill, USA) (Figure 2). Just before extraction, force magnitude was measure again (Table 1).

Patients were divided randomly into three groups, each one composed of eight arches (4 maxillary and 4 mandibular). In each patient, the left and right quadrants were randomly divided into experimental and control side. The mandibular or maxillary premolars without LLLT were used as the controls. The groups were divided as follow: Group 1 (G1): no intrusive force. LLLT was applied on the first day and the PM were extracted 24 hours after, since the literature has reported that the expression of these chemokines would be higher in the early hours. Group 2 (G2): intrusive force was delivered with a cantilever and LLLT were applied at the same first day. The PM were extracted 24 hours later. Group 3 (G3): intrusive force was delivered with a cantilever and LLLT were applied at the same first day. The patient returned 7 days later for a new LLLT. The PM were extracted on day 14 (Table 1), as an attempt to observe the kinetics of expression of these chemokines.

A Gallium Aluminum Arsenide semiconductor diode Laser (GaAlAs) (TF Premier, MM Optics Ltda., São Carlos, Brazil), with a wavelength of 808 nm (infrared radiation), calibrated, was applied in the buccal and lingual/palatal face of the PM periodontal area, with a single spot of application around the center of resistance, 40 seconds each (Figure 3A e 3B). The present mode of continuous waves at 100 mW output power was delivered through a conventional tip with a diameter of 3 mm^2 in direct contact with the overlying mucosa, producing a low intensity of 133 J per square centimeter (dose), with the total energy density in each application of 4 J. The tip of the device was always kept in contact with the overlying mucosa during application and was operated according to the manufacturer's instructions.

Safety glasses were used for both the operator and patient. The LLLT applications were made by the same operator to avoid interoperator variations (A.R.C).

The extractions were performed by the same dentist, through atraumatic technique. Immediately after extraction, the periodontal ligament (PDL) was scraped with the aid of periodontal curette (Golgran, São Paulo, Brazil) (Figure 4A), placed in plastic 1.5ml tubes and stored in a freezer -80°C for further analysis (Figure 4B).

Multiple serum chemokines (CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 and CXCL10) were simultaneously measured by flow cytometry using the Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokines Kit (BD Biosciences, San Diego, USA), according to the manufacturer's guidelines. Acquisition was performed with a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences). The instrument was checked for sensitivity and overall performance with Cytometer Setup & Tracking beads (BD Biosciences) prior to data acquisition. Quantitative results were generated using FCAP Array v1.0.1 software (Soft Flow Inc., Pecs, Hungary) and the results were expressed as picograms per 100 mg tissue.The data were subjected to Kolmogorov-Smirnov normality test, which demonstrated its normal distribution.

The paired t-test was used to assess the existence of differences in the variable "cytokine concentration in the periodontal ligament between the experimental side (Laser) and control". This analysis was performed separately for each of the cytokines and evaluated for each of the clinical conditions (24 hours after Laser application; 24 hours after application of orthodontic force + Laser; 14 days after application of orthodontic force + Laser).

The one way ANOVA followed by the *post hoc* Tukey test was used to assess the existence of differences in the variable "ratio of the cytokine concentration" (cytokine concentration in the experimental side divided by the cytokine concentration in the control side) between the different clinical conditions (24 hours after the Laser application, 24 hours after application of orthodontic force + Laser; 14 days after application of orthodontic force + Laser).

The level of significance was set at 5%. Analyses were performed using GraphPad Prism 5.6 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

RESULTS

A total of 48 first premolars were evaluated (24 maxillary, 24 mandibular). A mean of 8 pairs of teeth was allocated at each time point and demographic descriptions of the participants are in Table I.

The initially applied force magnitude of 0.98 N was gradually reduced to a mean of 0.61

N (± 0.18) in the control site and 0.62 N (± 0.17) in the experimental side, just before experimental teeth extraction ($p > 0.05$).

There was a reduction in the levels of all chemokines, except for CXCL8 and CXCL9 which had an increase in the expression 24 hours after LLLT application (G1), but the results were not statistically significant when compared to the control group (Table II). When the orthodontic force was applied, the expression of CCL2, CXCL8 and CXCL10 was diminished, but again, the results were not statistically significant (Table III). After 14 days of LLLT and mechanical loading, the levels of CCL2, CXCL8, CXCL9 and CXCL10 increased, while the expression of CCL5 reduced. However, there was no significant difference between the control and experimental groups (Table IV). When the chemokines were individually analyzed and their results compared in different time points, no significant difference was observed (Table V).

DISCUSSION

The use of LLLT has increased in the medical and dental fields. Some animal[6,16-18] and human clinical studies[5,8,10,11,19,20] have evaluated the effects of LLLT in OTM, and have reported an increase in the rate of tooth movement. However, just a small number of animal[6,18] and *in-vitro* studies[21] have tried to elucidate the biological reasons behind this possible acceleration, and very little is know about the effects of LLLT in the expression of biological mediators that are related to the recruitment, differentiation and activation of bone cells.

This is the first clinical study that evaluated whether the LLLT influences the chemokine expression in a model of OTM. The results of this preliminary study revealed that the LLLT did not significantly alter the expression of the chemokines CLL2, CLL5, CXCL8, CXCL9 and CXCL10 during a short term PM intrusion. Recent studies have demonstrated that LLLT accelerated OTM in rats[6] and humans[8] by increasing bone formation on the tension sides and the number of osteoclasts on the compression sides, as a result of cellular stimulation promoted by low-energy laser irradiation. If LLLT functions to enhance osteoclast recruitment and activation and, consequently, speed up the OTM, it seemed reasonable to believe that the expression of chemokines would be enhanced, since they provide key signals for trafficking, differentiation, and activity of bone cells.[22] However, this hypothesis was not supported by the results of this study, at least with the chemokines that were analyzed in this study. A previous animal study[23] reported that LLLT stimulated the velocity of tooth movement via RANK／RANKL expression at an early stage. Further studies are necessary to

evaluate if the same scenario can be found in humans.

Moreover, the exact mechanism of LLLT cell interaction is still unclear. The stimulation of photoreceptors in the mitochondrial respiratory chain, changing cellular ATP levels and cell membrane stabilization have been discussed previously.[24] It is generally accepted that Laser effects on cells are wavelength and dose dependent. The existence of a 'window-specificity' at certain wavelengths and energy dosages has been postulated.[25] Molecular absorption of Laser light is a prerequisite for any cellular effect. The absorption spectrum in fibroblast monolayers was investigated and it was shown that the cytochrome oxidases in particular are expected to absorb in the 800 - 830 nm range,[26,27] which justifies the reason this study used a wavelength of 808 nm.

A direct comparison between this study and previous studies is limited by a number of factors, such as different models and Laser parameters, such as output power, wavelength, energy density and dose used. Some researchers have also omitted descriptions of important aspects related to the study designs and the methods used for measuring the orthodontic force. Moreover, determining the levels of various cytokines after mechanical stimuli may contribute to better understanding of the PDL toward mechanical stress and their physiology. Considering the wide range of biologic responses and interfering factors that can reach the PDL, the number of subjects participating in this preliminary study may be a limiting factor and the results should be interpreted with caution. However, the results of this preliminar study might be used as references for planning further studies to evaluate the molecular mechanisms behind LLLT in OTM, since no previous research regarding this issue is available in the literature.

CONCLUSIONS

1- Low-intensity Laser therapy, with or without intrusive orthodontic force, does not cause significant changes in the expression of the chemokines CLL2, CLL5, CXCL8, CXCL9 and CXCL10, which are directly or indirectly involved in the trafficking, differentiation, and activity of bone cells.

2- Further studies are needed to determine the best LLLT parameters and protocols, and to evaluate the effects of LLLT in the expression of other biological modulators involved in OTM.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Fundação de Amparo a Pesquisas do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) for financial support.

REFERENCES

1. Yamasaki K, Shibata Y, Imai S, Tani Y, Shibasaki Y, Fukuhara T. Clinical application of prostaglandin E1 (PGE1) upon orthodontic tooth movement. Am J Orthod 1984;85:508-518.

2. Seifi M, Eslami B, Saffar AS. The effect of prostaglandin E2 and calcium gluconate on orthodontic tooth movement and root resorption in rats. Eur J Orthod 2003;25:199-204.

3. Loevschall H, Arenholt-Bindslev D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. Lasers Surg Med 1994;14:347-354.

4. Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1997;111:525-532.

5. Doshi-Mehta G, Bhad-Patil WA. Efficacy of low-intensity laser therapy in reducing treatment time and orthodontic pain: a clinical investigation. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2012;141:289-297.

6. Kawasaki K, Shimizu N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. Lasers Surg Med 2000;26:282-291.

7. Goulart CS, Nouer PR, Mouramartins L, Garbin IU, de Fatima Zanirato Lizarelli R. Photoradiation and orthodontic movement: experimental study with canines. Photomed Laser Surg 2006;24:192-196.

8. Cruz DR, Kohara EK, Ribeiro MS, Wetter NU. Effects of low-intensity laser therapy on the orthodontic movement velocity of human teeth: a preliminary study. Lasers Surg Med 2004;35:117-120.

9. Fujita S, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Low-energy laser stimulates tooth movement velocity via expression of RANK and RANKL. Orthod Craniofac Res 2008;11:143-155.

10. Genc G, Kocadereli I, Tasar F, Kilinc K, El S, Sarkarati B. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on orthodontic tooth movement. Lasers Med Sci 2013;28:41-47.

11. Sousa MV, Scanavini MA, Sannomiya EK, Velasco LG, Angelieri F. Influence of low-level laser on the speed of orthodontic movement. Photomed Laser Surg 2011;29:191-196.

12. Sousa MV, Pinzan A, Consolaro A, Henriques JF, de Freitas MR. Systematic literature review: influence of low-level laser on orthodontic movement and pain control in humans. Photomed Laser Surg 2014;32:592-599.

13. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M. Chemokines are upregulated during orthodontic tooth movement. J Interferon Cytokine Res 1999;19:1047-1052.

14. Graves DT, Jiang Y, Valente AJ. The expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other chemokines by osteoblasts. Front Biosci 1999;4:D571-580.

15. Volejnikova S, Marks SC, Jr., Graves DT. Tumor necrosis factor modulates apoptosis of monocytes in areas of developmentally regulated bone remodeling. J Bone Miner Res 2002;17:991-997.

16. Yoshida T, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Kato M, Arai Y, Kaneda T et al. Low-energy laser irradiation accelerates the velocity of tooth movement via stimulation of the alveolar bone remodeling. Orthod Craniofac Res 2009;12:289-298.

17. Khadra M, Kasem N, Haanæs HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 2004;97:693-700.

18. Altan BA, Sokucu O, Ozkut MM, Inan S. Metrical and histological investigation of the effects of low-level laser therapy on orthodontic tooth movement. Lasers Med Sci 2012;27:131-140.

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

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

21. 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;30:353-358.

22. Kapoor P, Kharbanda OP, Monga N, Miglani R, Kapila S. Effect of orthodontic forces on cytokine and receptor levels in gingival crevicular fluid: a systematic review. Prog Orthod 2014;15:65.

23. Fujita S, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Low-energy laser stimulates tooth movement velocity via expression of RANK and RANKL. Orthodontics & Craniofacial Research 2008;11:143-155.

24. Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation A review. Journal of Clinical Periodontology 1996;23:492-496.

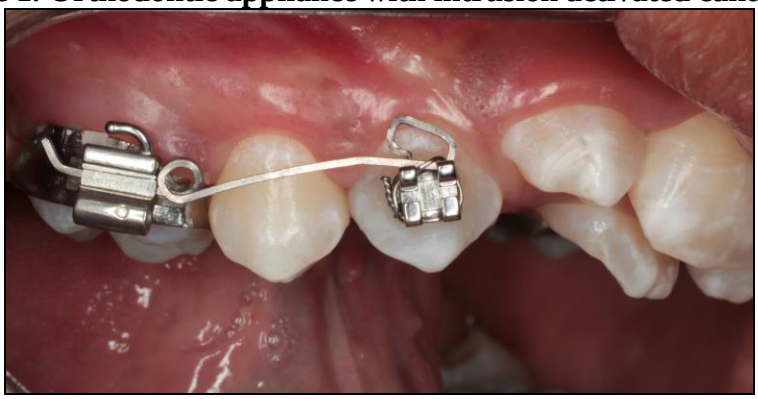
25. Karu TI. Effects of visible radiation on cultured cells. Photochem Photobiol 1990;52:1089-1098.

26. Lubart R, Wollman Y, Friedmann H, Rochkind S, Laulicht I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 1992;12:305-310.

27. van Breugel HHFI, Bär PRD. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. Lasers in Surgery and Medicine 1992;12:528-537.

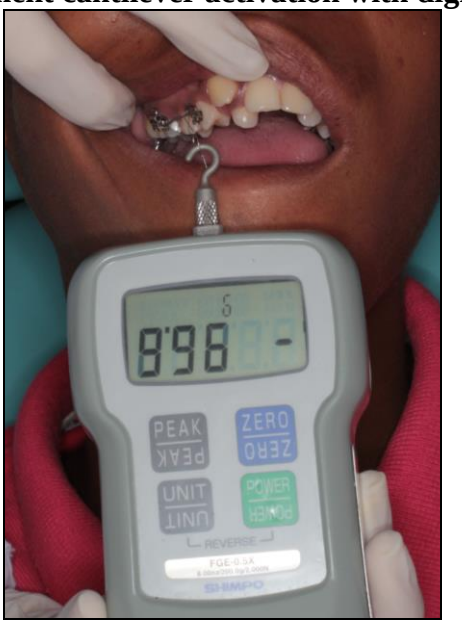
FIGURES

Figure 1. Orthodontic appliance with intrusion activated cantilever.



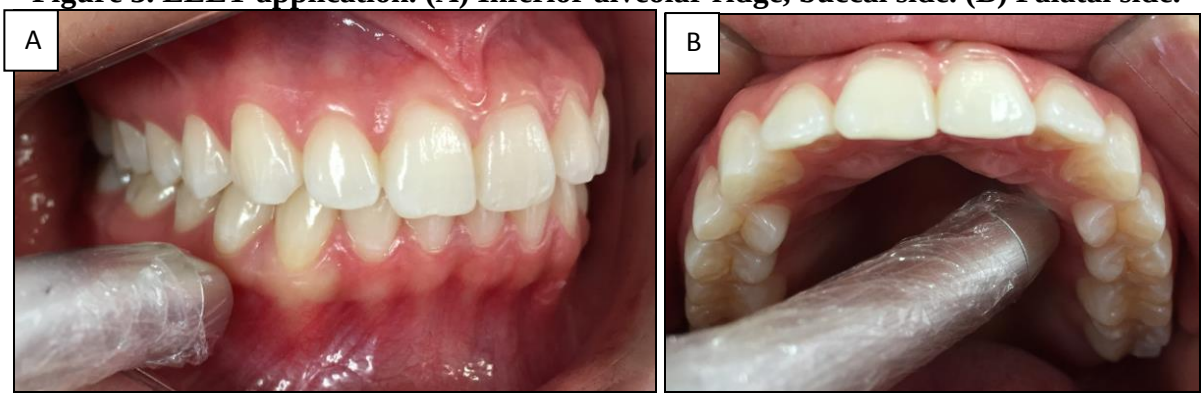
Source: Copyright.

Figure 2. Measurement cantilever activation with digital dynamometer.



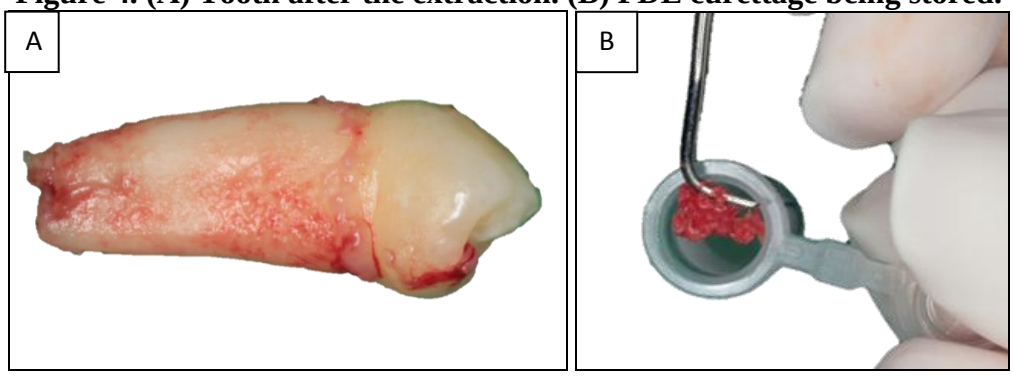
Source: Copyright.

Figure 3. LLLT application. (A) Inferior alveolar ridge, buccal side. (B) Palatal side.



Source: Copyright.

Figure 4. (A) Tooth after the extraction. (B) PDL curettage being stored.



Source: Copyright.

TABLES

Table I. Study design.

Groups	Force	Time point		N	Gender	Age* (y)
		Laser (Days)	Extraction			
G1	No	0	24 hours	8	6M, 2F	14.13 ± 2.47
G2	Yes	0	24 hours	8	6M, 2F	13.88 ± 2.30
G3	Yes	0; 7	14 days	8	2M, 6F	14.88 ± 3.40
Total				24	14M, 10F	14.3 ± 2.5

Values are mean +/- SD, standard deviation; $p > 0.05$ *.
M, Male; F, Female; N, number of pairs of teeth.

Table II. Mean and standard deviation of "chemokine concentration in the periodontal ligament" and the comparison between the experimental side (Laser) and control 24 hours after Laser application.

Chemokine	Control		Laser		Mean difference	*P*[1] value
	Mean	SD	Mean	SD		
CCL2	31135	33661	16643	14999	-14492	ns
CCL5	372954	181888	294144	197459	-78810	ns
CXCL8	74918	95790	87084	125259	12166	ns
CXCL9	174400	114996	251822	125172	77422	ns
CXCL10	12941	9342	12890	6797	-51,88	ns

[1]*P* value obtained by t-test paired (Control versus Laser); SD, standard deviation; ns, not significant (p> 0.05). The results are expressed in picograms.

Table III. Mean and standard deviation of the "chemokine concentration in the periodontal ligament" and the comparison between the experimental side (Laser) and control 24 hours after orthodontic force + Laser application.

Chemokine	Control		Laser		Mean difference	*P*[1] value
	Mean	SD	Mean	SD		
CCL2	73042	78953	33280	38075	-39762	ns
CCL5	333884	260644	489441	179842	155558	ns
CXCL8	69788	50626	30518	41125	-39270	ns
CXCL9	328211	332067	352303	383894	-2908	ns
CXCL10	26328	32386	9336	9211	-16991	ns

[1] *P* value obtained by t-test paired (Control versus Laser); SD, standard deviation; ns, not significant (p> 0.05). The results are expressed in picograms.

Table IV. Mean and standard deviation of the "chemokine concentration in the periodontal ligament" and the comparison between the experimental side (Laser) and control 14 days after orthodontic force + Laser application.

Chemokine	Control		Laser		Mean difference	*P*[1] value
	Mean	SD	Mean	SD		
CCL2	38793	30641	66698	34374	27905	ns
CCL5	225854	173087	160604	136494	-65250	ns
CXCL8	46295	27528	98815	86676	52520	ns
CXCL9	179633	170330	264365	186032	84732	ns
CXCL10	8000	9860	12754	9486	4754	ns

[1] *P* value obtained by t-test paired (Control versus Laser); SD, standard deviation; ns, not significant (p> 0.05). The results are expressed in picograms.

Table V. Mean and standard deviation of "ratio of the chemokine concentration" (cytokine concentration in the experimental side divided by the chemokine concentration in the control side) and a comparison between the different clinical conditions.

Chemokine	Clinical conditions						*P*[1] value		
	24 hours (1)		24 hours + Force (2)		14 days + Force (3)				
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	1 x 2	1 x 3	2 x 3
CCL2	1,46	1,16	1,28	1,13	1,51	1,03	ns	ns	ns
CCL5	0,93	0,34	1,03	0,55	0,91	0,49	ns	ns	ns
CXCL8	1,68	1,14	0,90	0,66	2,05	1,91	ns	ns	ns
CXCL9	1,23	0,39	0,97	0,43	1,02	0,40	ns	ns	ns
CXC10	1,18	0,35	1,54	1,60	1,03	0,57	ns	ns	ns

[1] *P* value obtained by one way ANOVA followed by the post hoc Tukey test for comparison between peers; SD, standard deviation; ns, not significant (p> 0.05); 24 hours (24 hours after Laser application); 24 hours + Force (24 hours after the application of orthodontic force + Laser); 14 days + Force (14 days after orthodontic force application + Laser). The results are expressed in picograms.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização do LBI tem sido cada vez mais frequente na clínica odontológica por produzir inúmeros benefícios aos pacientes nas diversas especialidades. Estudos recentes sugerem que o seu maior benefício na Ortodontia seja na aceleração da MDO.

Apesar de constatados os benefícios do LBI na aceleração da movimentação dentária ainda não há na literatura estudos biomoleculares que avaliem esta aceleração na remodelação óssea induzida por força ortodôntica.

Esse estudo é o primeiro estudo descrito na literatura que avaliou a cinética de algumas quimiocinas envolvidas na MDO e sua relação com o LBI. Por ser um estudo inovador e requerer materiais de alto custo, deve-se analisar uma amostra pequena e a partir dos resultados obtidos, planejar a elaboração de novos protocolos.

Os resultados da pesquisa não foram significativos, impossibilitando correlacionar às quimiocinas estudadas com o processo de aceleração da MDO e, devido à ausência de uma homogeneidade em relação aos protocolos de LBI na literatura, a correlação dos resultados com outros estudos é reduzida.

Com isso fica evidente que novos estudos, a partir desse, devem ser realizados, alterando alguns fatores, tais como o protocolo do Laser, as quimiocinas avaliadas, os tempos de coleta ou até mesmo a força aplicada, a fim de que se possa comparar e chegar a uma conclusão sobre os efeitos do LBI na MDO, o que permitirá no futuro aperfeiçoar sua utilização clínica para acelerar a movimentação ortodôntica, reduzindo tempo, custos e desconforto para os pacientes, além de possíveis efeitos deletérios nos tecidos dentários e de suporte.

REFERÊNCIAS

ALHASHIMI, N. et al. Chemokines are upregulated during orthodontic tooth movement. **Journal of Interferon & Cytokine Research,** v.19, n.9, p.1047-1052, Sept. 1999.

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

ANDRADE JR., I. et al. The role of tumor necrosis factor receptor type 1 in orthodontic tooth movement. **Journal of Dental Research,** v.86, n.11, p. 1089-1094, Nov. 2007.

ANDRADE JR., I.; TADDEI, S.A, SOUZA, P.E. Inflammation and tooth movement: the role of cytokines, chemokines and growth factors. **Seminars in Orthodontics**, v.18, n.4, p. 257-269, Dec. 2012.

ANGIOLILLO, A.L. et al. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. **The Journal of Experimental Medicine,** v.182, n.1, p. 155-162, July 1995.

BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S.; LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v.423, n.6937, p. 337-342, May 2003.

CHIHARA, J. The role of chemokines such as RANTES in allergic disease. **Rinsho Byori,** v.46, n.8, p. 816-820, Aug. 1998.

COLGATE PROFISSIONAL. **O que é uma boa higiene bucal?**, 2015. Disponível em: <http://www.colgateprofissional.com.br/pacientes/O-que-e-uma-boa-higiene-bucal/artigo>. Acesso em: 31 out. 2015.

COLLINS, M.K.; SINCLAIR, P.M. The local use of vitamin D to increase the rate of orthodontic tooth movement. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics,** v.94, n.4, p. 278-284, Oct. 1988.

CRUZ, D.R. et al. Effects of low-intensity laser therapy on the orthodontic movement velocity of human teeth: a preliminary study. **Lasers in Surgery and Medicine,** v.35, n.2, p. 117-120, 2004.

DAVIDOVITCH, Z. et al. Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. **Dental Clinics of North America,** v.32, n.3, p. 411-435, July 1988.

DOSHI-MEHTA, G.; BHAD-PATIL, W.A. Efficacy of low-intensity laser therapy in reducing treatment time and orthodontic pain: a clinical investigation. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics,** v.141, n.3, p. 289-297, Mar. 2012.

DUFOUR, J.H. et al. IFN-γ-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP- 10 in effector T cell generation and trafficking. **The Journal of Immunology,** v.168, p. 3195– 3204, 2002.

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

GOULART, C.S. et al. Photoradiation and orthodontic movement: experimental study with canines. **Photomedicine and Laser Surgery,** v.24, n.2, p. 192-196, Apr. 2006.

GRAVES, D.T.; JIANG, Y.; VALENTE, A.J. The expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other chemokines by osteoblasts. **Frontiers in Bioscience,** v.4, p. D571-580, July 1999a.

HASHIMOTO, F. et al. Administration of osteocalcin accelerates orthodontic tooth movement induced by a closed coil spring in rats. **European Journal of Orthodontics,** v.23, n.5, p. 535-545, Oct. 2001.

HOFFMANN, E. et al. Multiple control of interleukin-8 gene expression. **Journal of Leukocyte Biology,** v.72, n.5, p. 847–855, Nov. 2002.

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

KHADRA, M. et al. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,** v.97, n.6, p. 693-700, June 2004.

KOBAYASHI, Y.; UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N. Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression,** v.19, n.1, p. 61-72, 2009.

KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics,** v.129, n.4, p. 469.e1-32, Apr. 2006.

LEE, S. K.; LORENZO, J. Cytokines regulating osteoclast formation and function. **Current Opinion in Rheumatology,** v.18, n.4, p. 411-418, July 2006.

LEONARD, E.J; YOSHIMURA, T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). **Immunology Today**, 11, p. 97–101, 1990.

LIMPANICHKUL, W. et al. Effects of low-level laser therapy on the rate of orthodontic tooth movement. **Orthodontics and Craniofacial Research,** v.9, n.1, p. 38-43, Feb. 2006.

LOEVSCHALL, H.; ARENHOLT-BINDSLEV, D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine,** v.14, n.4, p. 347-354, 1994.

LU, Y., et al. Monocyte chemotactic protein-1 mediates prostate cancer-induced bone resorption. **Cancer Research,** v.67, n.8, p. 3646-3653, Apr. 2007.

MADUREIRA, D.F. et al. Kinetics of interleukin-6 and chemokine ligands 2 and 3 expression of periodontal tissues during orthodontic tooth movement. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics,** v.142, n.4, p. 494-500, Oct. 2012.

MEIKLE, M.C. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. **European Journal of Orthodontics**, v.28, n.3, p. 221-240, June 2006.

MÜLLER, M. et al. Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity--a tale of conflict and conundrum. **Neuropathol Appl Neurobiol,** v.36, n.5, p. 368-387, Aug. 2010.

NEVES, L.S. et.al. A utilização do laser em Ortodontia. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v.10, n.5, p. 149-156, Oct. 2005.

RAHIMI, P. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 expression and monocyte recruitment in osseous inflammation in the mouse. **Endocrinology,** v.136, n.6, p. 2752-2759, June 1995.

REITAN, K. Tissue behavior during orthodontic tooth movement. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics,** v.46, n12, p. 881-890, Dec. 1960.

RODY JR., W.J. **Osteoclast recruitment to sites of compression in orthodontic tooth movement.** 2000. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Washington, Seattle, 2000.

RODY, W.J.; KING, G.J.; GU, G. Osteoclast recruitment to sites of compression in orthodontic tooth movement. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics,** v.120, n.5, p. 477-489, Nov. 2001

ROODMAN, G.D. Osteoclast differentiation. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v.2, n.3, p. 389-409, 1991.

SAITO, S. et al. Interactive effects between cytokines on PGE production by human periodontal ligament fibroblasts in vitro. **Journal of Dental Research,** v.69, n.8, p. 1456-1462, Aug. 1990.

SAITO, S.; SHIMIZU, N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics,** v.111, n.5, p. 525-532, May 1997.

SEIFI, M.; ESLAMI, B.; SAFFAR, A.S. The effect of prostaglandin E2 and calcium gluconate on orthodontic tooth movement and root resorption in rats. **European Journal of Orthodontics,** v.25, n.2, p. 199-204, Apr. 2003.

SOUSA, M.V. et al. Influence of low-level laser on the speed of orthodontic movement. **Photomedicine and Laser Surgery,** v.29, n.3, p. 191-196, Mar. 2011.

TADDEI, S.R. et al. Role of CCR2 in orthodontic tooth movement. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics,** v.141, n.2, p. 153-160, Feb. 2012.

TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N.; SUDA, T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v.256, n.3, p. 449-455, Mar. 1999.

TAUB, D.D. et al. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. **Science,** v.260, n.5106, p. 355-358, Apr. 1993.

TEITELBAUM, S.L.; ROSS, F.P. Genetic regulation of osteoclast development and function. **Nature Reviews Genetics**, v.4, n.8, p. 638, Aug. 2003.

TUNCER, B.B., et al. Levels of interleukin-8 during tooth movement. **The Angle orthodontist,** v.75, n.4, p. 631-636, July 2005.

VOLEJNIKOVA, S.; MARKS, S.C.; GRAVES, D.T. Tumor necrosis factor modulates apoptosis of monocytes in areas of developmentally regulated bone remodeling**. Journal of Bone and Mineral Research,** v.17, n.6, p. 991-997, June 2002.

YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. **Clinica Chimica Acta,** v.411, n.21-22, p. 1570-9, Nov. 2010.

YAMASAKI, K. et al. Clinical application of prostaglandin E1 (PGE1) upon orthodontic tooth movement. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics,** v.85, n.6, p. 508-518, June 1984.

YAO, Z., et al. Osteoclast precursor interaction with bone matrix induces osteoclast formation directly by an interleukin-1-mediated autocrine mechanism. **The Journal of Biological Chemistry,** v.283, n.15, p. 9917-9924, Apr. 2008.

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

YOUSSEF, M. et al. The effect of low-level laser therapy during orthodontic movement: a preliminary study. **Lasers in Medical Science,** v.23, n.1, p. 27-33, Jan. 2008.

YU, X.; GRAVES, D.T. Fibroblasts, mononuclear phagocytes, and endothelial cells express monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) in inflamed human gingiva. **Journal Periodontology,** v.66, n.1, p. 80-88, Jan. 1995.

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PUC Minas

Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

N.º Registro no CEP: CAAE - 29333414.9.0000.5137

Título do Projeto: Efeitos do laser de baixa intensidade na remodelação óssea induzida por força ortodôntica.

Prezado (a) Senhor (a),

Este Termo de Consentimento pode conter palavras que você não entenda. Peça ao pesquisador que explique as palavras ou informações não compreendidas completamente.

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa que estudará o efeito do Laser na aceleração da movimentação dos dentes durante o tratamento ortodôntico. O planejamento do seu tratamento ortodôntico inclui a extração de dentes pré-molares e utilização de aparelho para movimentar os dentes a ser removido e posteriormente os caninos. O Laser de baixa intensidade é utilizado para tratamento de vários problemas na boca, como inflamação, e não causa lesões na boca. Alguns pesquisadores já observaram que a aplicação do Laser acelera a movimentação dos dentes durante a utilização de aparelhos, o que pode facilitar o tratamento ortodôntico. Para participar desta pesquisa, solicito sua autorização para que os pesquisadores realizem a aplicação do Laser antes e durante a extração dos dentes pré-molares, os quais tem indicação de extração conforme planejamento do seu tratamento. Solicito também autorização para coletar material raspado das raízes dos dentes extraídos e realizar coleta do líquido que sai do sulco da gengiva dos dentes caninos antes e durante a movimentação do dente pelo aparelho ortodôntico.

A aplicação do Laser não causa nenhum risco e/ou desconforto ao paciente e consiste em um feixe de luz. A extração dos dentes pré-molares será realizada conforme é feito para todos os dentes, sob anestesia local. A coleta do fluido do sulco da gengiva dos dentes caninos será realizada colocando uma fina fita de papel dentro do sulco da gengiva, o que não causa nenhum desconforto ao paciente. Todos esses procedimentos são indolores e serão realizados por um pesquisador com experiência. A participação nesta pesquisa não trará riscos adicionais a você. Espera-se que, como resultado deste estudo, você possa contribuir para o melhor conhecimento sobre como o Laser atua nas células, acelerando o tratamento, o que auxiliará os ortodontistas a executarem tratamentos mais eficientes e em menor tempo.

Você não terá nenhum gasto com a sua participação no estudo, apenas custo de deslocamento e não receberá pagamento pelo mesmo. Não haverá ressarcimento de custos. Sua participação neste estudo é voluntária. Você tem o direito de não querer participar ou de sair deste estudo a qualquer momento.

A sua identidade será mantida em sigilo. Os resultados do estudo serão sempre apresentados como o retrato de um grupo e não de uma pessoa. Dessa forma, você não será identificado (a) seja para propósitos de publicação científica ou educativa.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, coordenado pela Prof.ª Cristiana Leite Carvalho, que poderá ser contatado em caso de questões éticas, pelo telefone 3319-4517 ou email cep.proppg@pucminas.br.

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo poderão fornecer qualquer esclarecimento sobre o estudo, assim como tirar dúvidas, bastando contato no seguinte endereço e/ou telefone:

Nome dos pesquisadores: **Alessandra Raid Carneiro** (aluna do Mestrado em Ortodontia da PUC Minas). E-mail: aleraid@hotmail.com e **Ildeu Andrade Junior** (Professor do Departamento de Odontologia da PUC Minas). E-mail: ildeu_andrade@yahoo.com.br. Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500, prédio 46, clínica 2, Coração Eucarístico, Belo Horizonte, MG, CEP 30310-060. Telefone: 31 3319-4412.

Declaração de Consentimento

Li ou alguém leu para mim as informações contidas neste documento antes de assinar este termo de consentimento. Declaro que toda a linguagem técnica utilizada na descrição deste estudo de pesquisa foi satisfatoriamente explicada e que recebi respostas para todas as minhas dúvidas. Autorizo a aplicação do Laser, coleta de material do meu dente após extração e coleta do líquido do sulco gengival, além da utilização dos mesmos para a realização dos experimentos científicos. Permito também a utilização dos resultados para propósitos de publicação científica ou educativa, respeitando sempre meu direito de não ser identificado (a). Confirmo também que recebi uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Compreendo que sou livre para me retirar do estudo em qualquer momento, sem perda de benefícios ou qualquer outra penalidade. Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade para participar deste estudo.

Nome do participante (em letra de forma):

_____

Assinatura do participante ou representante legal Data

_____

Nome (em letra de forma) e assinatura do pesquisador Data

ANEXO B - Termo de Assentimento

PUC Minas

Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-graduação
Comitê de Ética em Pesquisa

TERMO DE ASSENTIMENTO

(Elaborado de acordo com a Resolução 466/2012-CNS/CONEP)

Você está sendo convidado a participar da pesquisa "Efeitos do laser de baixa intensidade na remodelação óssea induzida por força ortodôntica" realizada pela aluna do mestrado em Ortodontia Alessandra Raid Carneiro e orientada pelo Professor Dr. Ildeu Andrade Jr. cujo objetivo é avaliar o efeito do Laser na aceleração da movimentação dos dentes durante o tratamento ortodôntico.

Para realização deste trabalho usaremos aparelhos fixos e molas, que vão ajudar a movimentar os dentes e o Laser. Para que se consiga colocar todos os dentes na posição correta, é necessário que sejam removidos 04 dentes (primeiros pré-molares) que será feito logo antes de colocar o aparelho fixo.

Seu nome assim como todos os seus dados serão mantidos sob sigilo absoluto, antes, durante e após o término da pesquisa. Quanto aos riscos e desconfortos, este estudo não apresenta riscos e/ou desconfortos em relação ao uso do Laser. Os resultados desta pesquisa irão ajudar ao dentista a usar um mecanismo que acelera a movimentação dos dentes, diminuindo assim o tempo de tratamento e beneficiando tanto o profissional quanto o paciente.

Durante o desenvolvimento da pesquisa você tem os seguintes direitos: a) garantia de esclarecimento e resposta a qualquer pergunta; b) liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento, mesmo que seu pai ou responsável tenha consentido sua participação, sem prejuízo para você ou para seu tratamento.

Você não terá nenhuma despesa ao participar desta pesquisa, exceto de deslocamento. Nos casos de dúvidas você deverá falar com seu pai, mãe ou responsável, para que ele procure o

pesquisador responsável, a fim de resolver seu problema. Os dados do pesquisador encontram-se ao final deste documento.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, coordenado pela Prof.ª Cristiana Leite Carvalho, que poderá ser contatado em caso de questões éticas, pelo telefone 3319-4517 ou email cep.proppg@pucminas.br

Assentimento Livre e Esclarecido

Eu (_____) confirmo que recebi todos os esclarecimentos necessários, e concordo em participar desta pesquisa. Desta forma, assino este termo, juntamente com o pesquisador responsável, em duas vias, ficando uma via sob meu poder e outra em poder do pesquisador.

_____ Data _____/_____/_____

Assinatura do menor

Nome:

Endereço:

Fone: ( )

_____ Data _____/_____/_____

Alessandra Raid Carneiro

. Pesquisadora responsável: Alessandra Raid Carneiro - Av. Dom José Gaspar, 1183 - Coração Eucarístico - CEP 30535 610 - Belo Horizonte/MG. Fone: (31) 3319-4412 - e-mail: aleraid@hotmail.com

. Professor orientador: Ildeu Andrade Jr. - Av. Dom José Gaspar, 500 – Prédio 46 - Clinica 2- Coração Eucarístico CEP 30535 901 - Belo Horizonte/MG. Fone: (31) 3319-4456 - e-mail: ildeu_andrade@yahoo.com.br

CEP PUC Minas: Av. Dom José Gaspar, 500 – Prédio 3 - 2º andar – sala: 228. Coração Eucarístico - CEP 30535 901 - Belo Horizonte/MG. Telefone: (31) 3319-4517 – email: cep.proppg@pucminas.br

ANEXO C - Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/PUC Minas)

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS - PUCMG

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos do laser de baixa intensidade na remodelação óssea induzida por força ortodôntica

Pesquisador:

ALESSANDRA RAID CARNEIRO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 29333414.9.0000.5137

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUCMG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 731.586

Data da Relatoria: 12/08/2014

Apresentação do Projeto:

A ortodontia é uma especialidade da odontologia cuja prática tem se tornado cada vez mais presente na vida de grande parte da população, não só pelo seu apelo funcional como também estético. Porém, existe uma constante necessidade por parte dos pacientes e ortodontistas em ter um tratamento eficaz e eficiente, com maior conforto ao paciente e menor tempo possível. Diversos mecanismos têm sido estudados buscando alcançar estes objetivos e um dos mais notórios é o uso do Laser terapêutico de baixa intensidade (LBI). Sua função, entre outras, está em acelerar a movimentação ortodôntica dentária (MDO) e, portanto, reduzir o tempo do tratamento ortodôntico. Devido à carência de estudos em humanos nessa área, pouco ainda se sabe sobre seus efeitos nos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na remodelação óssea induzida por força ortodôntica. O estudo destes mecanismos é de fundamental importância para a compreensão dos efeitos do LBI na MDO, o que permitirá no futuro otimizar sua utilização clínica para acelerar a movimentação ortodôntica, reduzindo tempo, custos e desconforto para os pacientes, além de possíveis efeitos deletérios nos tecidos dentários e de suporte. Consistirá de 30 pacientes saudáveis (Grupo I e Grupo II, de ambos os sexos, que necessitam de exodontia de pelo menos 2 pré-molares bilaterais maxilares e/ou mandibulares, como parte do tratamento

ortodôntico). Serão excluídos pacientes em uso de medicamentos que possam interferir no metabolismo ósseo, tais como anti-inflamatórios, antibióticos e suplementos hormonais, aqueles com presença de mordida cruzada esquelética, hábitos parafuncionais e/ou interferência oclusal. Caninos impactados com dilaceração de raiz também serão critérios de exclusão, pois dificultam o movimento dentário e aumentam as chance de reabsorção de raiz.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar os efeitos do laser de baixa intensidade (LBI) na remodelação óssea e MDO.

Objetivos Secundários:

a)Avaliar os efeitos do LBI na expressão dos mediadores inflamatórios TNF-a, CCL2, CCL3, CCL5 e IL-10 por células do ligamento periodontal de dentes submetidos ou não à força ortodôntica.

b)Avaliar a influência do LBI na reabsorção radicular induzida por força ortodôntica. c)Avaliar o efeito do LBI na taxa de MDO.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: para o pesquisador não há riscos previsíveis. Entretanto, mesmo o tratamento convencional implica em algum nível de risco e/ou desconforto.

Benefícios:

Tratamento ortodôntico com tempo de execução reduzida.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

ndn.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram anexados e estão de acordo com as normas vigentes.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pela aprovação do projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS - PUCMG

Continuação do Parecer: 731.586

Considerações Finais a critério do CEP:

BELO HORIZONTE, 29 de Julho de 2014

Assinado por:

CRISTIANA LEITE CARVALHO
(Coordenador)

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228
Bairro: Coração Eucarístico **CEP:** 30.535-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3319-4517 **Fax:** (31)3319-4517 **E-mail:** cep.proppg@pucminas.br

ANEXO D - Cartilha Sobre Orientação de Escovação

Instrução de Higiene Oral

- Escovar bem os dentes e usar o fio dental diariamente.
- Ingerir alimentos balanceados e evitar comer entre as principais refeições.
- Usar produtos de higiene bucal, inclusive creme dental, que contenham flúor.
- Usar enxaguante bucal com flúor, caso seu dentista recomende.
- Garantir que crianças abaixo de 12 anos tomem água potável fluoretada ou suplementos de flúor, se habitarem regiões onde não haja flúor na água.

Técnicas corretas de escovação:

Coloque a escova em um ângulo de 45 graus em relação à gengiva. Movimente a escova, afastando-a da gengiva.

Escove delicadamente as partes internas, externas e de mastigação de cada dente com movimentos curtos de trás para frente.

Com cuidado, escove a língua para remover bactérias e purificar o hálito.

Uso correto do fio dental:

Use aproxima-damente 40 centímetros de fio, deixando um pedaço livre entre os dedos.

Siga, com cuidado, as curvas dos dentes.

Assegure-se de limpar além da linha da gengiva, mas não force demasiado o fio contra a gengiva.

Fonte: COLGATE PROFESSIONAL, 2015.