



Universidade de **São Paulo**  
Faculdade de **Odontologia** de  
**Ribeirão Preto**  
**FORP-USP**



---

MARIANA DE SOUZA CARNEIRO

**Avaliação do RANK, RANKL e OPG liberados após a  
expansão rápida da maxila, em ratos fumantes.**

---

Ribeirão Preto  
2018

MARIANA DE SOUZA CARNEIRO

**Avaliação do RANK, RANKL e OPG liberados após a  
expansão rápida da maxila, em ratos fumantes.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Clínica Infantil, como requisito parcial à obtenção do título de Cirurgiã Dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani.

Ribeirão Preto  
2018

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, minha família, amigos e professores pelo apoio, amor e paciência durante o curso de graduação.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus que me abençoou em toda caminhada e que permitiu que eu tivesse tantas conquistas e aprendizados nessa jornada, porque Ele é bom o tempo todo.

Agradeço aos meus pais por estarem comigo nos momentos mais difíceis, por serem meus maiores incentivadores e por todo esforço que sempre fizeram para que esse sonho chamado FORP se realizasse.

Agradeço aos meus irmãos que junto com meus pais são meu alicerce e minha fonte de amor. E a toda a minha família que apesar da distância física sempre esteve comigo.

Agradeço a minha orientadora, que foi e é grande inspiração, não só como profissional, mas como pessoa, por todos os ensinamentos, oportunidades e por marcar minha vida em dois momentos importantes, primeiro como paciente e depois como aluna.

Agradeço aos grandes mestres que tive durante a minha formação, em especial para aqueles que além de ótimos professores são também pessoas maravilhosas e que realizam a docência com tanto amor e dedicação.

Por fim, agradeço aos meus amigos, que dividiram tantos momentos comigo, que foram muitas vezes minha segunda família e me ensinaram tantas coisas, que tornaram o caminhar mais leve e cheio de amor.

Carneiro, Mariana Souza. **Avaliação do RANK, RANKL e OPG liberados após a expansão rápida da maxila, em ratos fumantes.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2018.

## RESUMO

**Introdução:** O hábito de fumar é bastante comum e, na maioria das vezes, inicia-se ainda na adolescência. Dentre as diversas alterações sistêmicas provocadas, o comprometimento do processo de reparo celular é de grande importância na compreensão dos movimentos dento-esqueléticos. Não existem evidências científicas que correlacionem este hábito e suas influências no tratamento ortodôntico/ortopédico, especialmente no tocante às análises celulares e moleculares.

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar o processo de remodelação óssea após aplicação de forças ortopédicas em ratos fumantes. **Material e Métodos:** Um total de 60 ratos Wistar foram divididos em 4 grupos (n=15): controle negativo [sutura intacta, sem fumaça de cigarro (FC)], grupo experimental I (sutura intacta e com FC), grupo experimental II [expansão rápida da maxila (ERM) e sem FC] e grupo experimental III (ERM+FC). Cada grupo foi subdividido em 3 períodos experimentais de avaliação (n=5) sendo os animais de cada subgrupo submetidos à eutanásia após 7, 14, e 21 dias após a expansão maxilar ortopédica. Foram avaliadas as mudanças na expressão gênica de *Rank*, *Rankl*, osteoprotegerina (*Opg*) por meio de qRT-PCR. Os resultados foram agrupados de acordo com os diferentes grupos de estudo e de período experimental, submetidos à Anova (one-way/two-way) seguidos pelo pós-teste de Tukey e Bonferroni ( $p < 0,05$ ). **Resultados:** Houve estímulo à osteoclastogênese nos grupos submetidos à ERM, com menor magnitude naquele que também foi exposto à fumaça de cigarro. Os marcadores de osteogênese foram estimulados apenas nos animais submetidos à ERM, durante todos os períodos avaliados. **Conclusão:** A exposição à fumaça de cigarro associada à expansão rápida da maxila prejudicou o processo de reparo ósseo nos diferentes tempos analisados, tornando-o mais lento e desorganizado.

**Palavras-chave:** fumaça de cigarro, força ortopédica, expansão rápida da maxila, remodelação óssea, reparo ósseo.

Souza, Mariana Carneiro. **Avaliação do RANK, RANKL e OPG liberados após a expansão rápida da maxila, em ratos fumantes**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2018.

## ABSTRACT

**Introduction:** Smoking is very common, and most of the time it starts as a teenager. Among the several systemic alterations provoked, the cellular repair process is of great importance in the understanding of dento-skeletal movements. There is no scientific evidence to correlate this habit and its influences in orthodontic / orthopedic treatment, especially with respect to cellular and molecular analyzes. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the bone remodeling process after the application of orthopedic forces in smoking rats. **Material and Methods:** A total of 60 Wistar rats were divided into 4 groups (n = 15): negative control [intact suture, no cigarette smoke (FC)], experimental group I (intact and with CF suture), experimental group II [rapid expansion of the maxilla (ERM) and without FC] and experimental group III (ERM + FC). Each group was subdivided into 3 experimental periods of evaluation (n = 5) and the animals of each subgroup were submitted to euthanasia after 7, 14, and 21 days after maxillary orthopedic expansion. Changes in the gene expression of Rank, Rankl, osteoprotegerin (Opg) by qRT-PCR were evaluated. The results were grouped according to the different groups of study and experimental period, submitted to the Anova (one-way / two-way) followed by the post-test of Tukey and Bonferroni ( $p < 0.05$ ). **Results:** There was stimulation to osteoclastogenesis in the groups submitted to MRA, with a lower magnitude in the one that was also exposed to cigarette smoke. Osteogenesis markers were stimulated only in the animals submitted to MRA, during all periods evaluated. **Conclusion:** Exposure to cigarette smoke associated with rapid maxillary expansion impaired the bone repair process at different times, making it slower and more disorganized.

**Keywords:** Smoking cigarrtte, rapid maxillary expansion, bone remodeling, bone repair.

**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	09
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	12
<b>3. OBJETIVOS</b>	13
<b>4. MATERIAL E MÉTODO</b>	14
<b>5. RESULTADO</b>	22
<b>6. DISCUSSÃO</b>	26
<b>7. CONCLUSÃO</b>	34
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	34



## 1. INTRODUÇÃO

A movimentação dentária é a base do tratamento ortodôntico. De acordo com Moyers (1991), o aparelho ortodôntico é um sistema que armazena e libera forças sobre dentes, músculos ou ossos, criando uma reação dentro do ligamento periodontal e no osso alveolar, provocando movimento dentário, alterando a morfologia óssea ou seu crescimento. A forma como o tecido ósseo responde à aplicação de forças nestes casos específicos ainda é pouco compreendida em termos biomoleculares. (Krishnan e Davidovitch, 2006).

O movimento dentário é baseado no princípio biológico de que uma pressão prolongada aplicada aos dentes resulta em remodelação das estruturas periodontais como osso alveolar e ligamento periodontal. (Kirkanydes et al., 2000). A transmissão da força gera uma resposta biológica descrita por Garlet e colaboradores (2007) como uma inflamação aguda e não patológica. Segundo Hughes (2000), este evento inflamatório desencadeia mudanças vasculares, síntese e liberação de prostaglandinas, citocinas e fatores de crescimento, os quais induzem à diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos e osteoclastos, responsáveis, respectivamente pela deposição e reabsorção do osso alveolar. A reabsorção da matriz óssea e a remodelação do colágeno extracelular ocorrem nas áreas de compressão e a deposição de osso alveolar e de colágeno, nas áreas de tração do ligamento periodontal. (Nakagawa et al., 1994; Krishnan et al., 2006; Masella & Meister, 2006).

O hábito de fumar cigarros deve ser considerado com certa importância pelo profissional ortodontista e odontopediatra uma vez que os fumantes têm uma saúde periodontal e regeneração tecidual muito pior do que os não fumantes, o que determina cuidados terapêuticos multidisciplinares (Collett et al., 1999). Além disso, não só o fumante sofre com os efeitos prejudiciais característicos deste hábito. Em estudo recente, apoiado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que morrem todos os anos no mundo mais de 600 000 não fumadores devido à exposição passiva ao fumo e que 28% destas mortes são crianças (Öberg et al., 2011).

A literatura apresenta uma série de eventos biológicos que alteram o nível local de mediadores químicos relacionados à remodelação óssea em resposta a um estímulo, representado pelas forças aplicadas via aparelho ortodôntico nos lados de pressão e tração.

(Krishman e Davidovitch, 2006), mas não esclarece o papel do hábito de fumar frente a estes mediadores. A nicotina, um importante componente do cigarro, acelerou o movimento dental ortodôntico em primeiros molares e incisivos superiores de ratos, em virtude da produção de prostaglandinas e o aumento da função de reabsorção dos osteoclastos (Sodagar et al., 2011).

Alguns dos efeitos da nicotina podem prejudicar o processo de reparo, como a liberação de catecolaminas que diminuem a perfusão tecidual e a alteração no metabolismo dos fibroblastos (Tipton e Dabbous, 1995), além da diminuição da proliferação de hemácias, macrófagos e fibroblastos (Sherwin e Gastwirth, 1990). Outro componente da fumaça de cigarro que pode influenciar negativamente a reparação tecidual é o cianeto de hidrogênio, substância altamente tóxica utilizada em diversas áreas como inseticida e gás letal em execuções. O cianeto tem uma afinidade muito alta pelo ferro no estado férrico. Quando absorvido, reage prontamente com o ferro trivalente da citocromo oxidase na mitocôndria. A respiração celular é inibida resultando em acidose láctica e hipóxia citotóxica (Klaassen, 1996). Essas alterações enzimáticas na respiração celular podem prejudicar o processo de reparação dos tecidos (Mosely e Finseth, 1977).

O tabaco provoca sobre as células endoteliais um aumento no nível do fator pré-coagulante Von Willenbrand. Estes danos endoteliais prejudicam o reparo após movimentação ortodôntica em fumantes. Seguindo o comprometimento endotelial, existe o prejuízo à adesão e migração de células competentes para os sítios a serem reparados. A secreção dos fatores de crescimento celular pelas células endoteliais pode ser prejudicada, resultando em menor estimulação e ativação de linhagens imaturas de células. (Grossi et al, 1996).

A nicotina, o monóxido de carbono e o cianeto são os elementos da fumaça de cigarro mais comumente relacionados a um pior processo de reparo (Silverstein, 1992; Haverstoch e Mandracchia, 1998). Outros componentes de cigarro, como a acroleína e o acetaldeído têm mostrado *in vitro* um efeito prejudicial na proliferação e adesão de células importantes para o processo de cicatrização (fibroblastos) (Cattaneo et al., 2000). Autores como Silverstein (1992) relatam ainda que outros constituintes da fumaça de cigarro também podem ter efeitos negativos sobre a reparação tecidual.

Alguns trabalhos *in vitro* têm demonstrado que a fumaça de cigarro e seus componentes apresentam efeitos negativos em culturas de células ósseas. Ramp et al. (1988) estudaram o efeito da nicotina sobre as culturas de células do tipo osteoblasto. Os

resultados mostraram que a nicotina inibiu a atividade da fosfatase alcalina e a síntese de colágeno num padrão dose-dependente. Em 2001, Liu e colaboradores realizaram um experimento avaliando a ação direta da fumaça de cigarro sobre as células osteoprogenitoras humanas. Observaram que a fumaça de cigarro inibiu a proliferação das células osteoprogenitoras em células tipo osteoblasto.

A análise da chamada qualidade óssea, sob o ponto de vista molecular, tem grande potencial para contribuir para um melhor entendimento dessa característica de formação óssea em fumantes submetidos à disjunção da maxila. A identificação molecular de reguladores da reabsorção e formação óssea pode contribuir para a investigação da fisiopatologia óssea nas áreas submetidas à disjunção e pode, em associação aos exames de imagem, caracterizar melhor a qualidade óssea.

Neste contexto, uma das principais vias de diferenciação e ativação dos osteoclastos envolve o sistema RANK (receptor ativador do fator nuclear kappa B) - RANKL (RANK ligante) – OPG (osteoprotegerina). O RANKL é uma molécula importante para a diferenciação das células hematopoiéticas progenitoras em osteoclastos maduros e exerce seus efeitos por meio de sua ligação ao receptor RANK. Por outro lado, a osteoclastogênese é bloqueada na presença da OPG (Boyle et al., 2003), uma vez que quando OPG está ligada ao RANKL, este não pode ligar-se ao RANK, impossibilitando dessa forma que as células osteoprogenitoras se diferenciem em osteoclastos e não haja reabsorção óssea. O desequilíbrio desse sistema RANK/RANKL/OPG é observado na osteoporose, artrite reumatoide, doença periodontal (Boyle et al., 2003; Amorim et al., 2008) e recentemente foi demonstrado em lesões fibro-ósseas da maxila e mandíbula (Elias et al., 2010).

Sabe-se que a carga mecânica induz a proliferação e a diferenciação das células ósseas e a síntese da matriz extracelular através de várias macromoléculas, dentre elas a osteopontina, osteocalcina, sialoproteína óssea (Nomura e Takano-Yamamoto, 2000; Ivanovsky et al., 2001; Ehrlich e Lanyon, 2002). Quando uma força mecânica é aplicada no osso, o estresse é detectado por determinadas células, induzindo a remodelação óssea. Essas células mecano-responsáveis são em sua maioria osteoblastos e osteoclastos (Ehrlich e Lanyon, 2002).

Desta forma, a investigação da relação entre a expressão de marcadores da reabsorção e da formação óssea pode contribuir para o entendimento da fisiologia dos diferentes tipos ósseos e abrir novos caminhos na definição da “qualidade óssea”, conferindo bases para que outros estudos permitam conhecer o real impacto dessa

característica óssea no resultado dos tratamentos ortodônticos com disjunção da maxila. O objetivo deste estudo será compreender a biodinâmica da remodelação óssea após movimentação ortodôntica em ratos submetidos à inalação de fumaça de cigarro.

## **2. JUSTIFICATIVA**

O tabagismo é considerado uma doença pediátrica pela Organização Mundial da Saúde (OMS) tendo em vista que 90% dos fumantes começam a fumar até os 19 anos. Estima-se que entre 82 mil a 99 mil jovens começam a fumar a cada dia no mundo. A experimentação de cigarros vem aumentando entre escolares brasileiros, com maiores índices entre as meninas adolescentes. Dos experimentadores, 50% tornar-se-ão fumantes regulares na vida adulta.

Os efeitos nocivos desse hábito não se limitam apenas ao organismo do indivíduo fumante. O tabagismo passivo caracteriza-se pelo ato de inalar a fumaça de derivados do tabaco (cigarro, charuto, cigarrilhas, cachimbo e outros produtores de fumaça) proveniente de um fumante, fazendo com que os malefícios do fumo ocorram mesmo em não-fumantes. O ar poluído contém, em média, três vezes mais nicotina, três vezes mais monóxido de carbono, e até cinquenta vezes mais substâncias cancerígenas do que a fumaça que entra pela boca do fumante depois de passar pelo filtro do cigarro (Ministério da Saúde, 2002).

De acordo com dados da OMS, aproximadamente dois bilhões de pessoas são vítimas do fumo passivo no mundo, sendo que destas, 700 milhões são crianças, que sofrem com maior incidência de bronquites, pneumonia e infecções de ouvido, entre outras doenças. No Brasil, as crianças são 40% das vítimas do fumo passivo. Crianças expostas à fumaça do cigarro têm maior risco de apresentarem doenças infecciosas do trato respiratório (bronquite, pneumonia e asma), otite média, doenças cardiovasculares, distúrbios de comportamento e do desenvolvimento neurológico e câncer, principalmente do pulmão. Todos estes efeitos são muito semelhantes aos descritos em adultos, mas as crianças são mais suscetíveis à toxicidade da fumaça do cigarro por serem imaturos em sua constituição.

Em bebês, observa-se um risco 5 vezes maior de morte súbita sem uma causa aparente (Síndrome da Morte Súbita Infantil) e maior risco de manifestarem doenças pulmonares até 1 ano de idade, proporcionalmente ao número de fumantes em casa. Filhos de fumantes parecem ter dificuldade de aprendizado, atraso no desenvolvimento da linguagem e mais problemas de comportamento, como hiperatividade, distúrbios de conduta

e desatenção. Por fim, crianças que são fumantes passivas têm mais chances de tornarem-se fumantes no futuro.

A instalação de forças ortopédicas em pacientes fumantes submetidos à inalação de fumaça tem sido pouco estudada na literatura. O conhecimento dos diversos fatores que interferem no processo de formação óssea neste tipo de paciente ainda representa um desafio na área de Ortodontia.

Descobertas recentes na área de remodelação óssea, mais especificamente no campo dos biomarcadores de turnover ósseo, tem tornado as pesquisas sobre tratamento ortodôntico e aplicação de forças ortopédicas mais direcionadas e focadas principalmente na análise das proteínas envolvidas durante estes processos. Uma vez que os marcadores de turnover ósseo são derivados do osso cortical e trabecular, eles refletem a atividade metabólica do tecido ósseo (Cox et al., 2010), além de fornecer uma visão dinâmica do processo de formação e reabsorção óssea funcionando como indicadores da função dos osteoblastos e dos osteoclastos, assim como da formação e da reabsorção óssea (Camozzi et al., 2007). Desta maneira, um melhor entendimento das mudanças dos marcadores do turnover ósseo durante a aplicação de forças ortopédicas no tecido ósseo, sob a influência da exposição à fumaça de cigarro, é de grande interesse, uma vez que esta análise é inédita e pode fornecer dados importantes relacionados à formação ou reabsorção óssea em situações adversas induzidas pelas toxinas do cigarro. Portanto, é importante avaliar neste contexto e em uma mesma pesquisa a presença de RANK, RANK-L, osteoprotegerina (OPG), fatores envolvidos na sinalização osteoblasto-osteoclasto, assim como, avaliar as proteínas não-colágenas como a osteonectina (ONC), osteocalcina (OCC), sialoproteína óssea (BSP), osteopontina (OPN) e proteína morfogenética óssea (BMP) 2, proteínas indicadores de atividade celular, que são secretadas pelos osteoblastos e que estão envolvidas no processo de formação óssea.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

- Avaliar *in vivo* a influência da fumaça de cigarro sobre a remodelação óssea.

### **3.2. Objetivos Específicos**

- Quantificar a expressão de RANK, RANK-L e OPG no tecido ósseo submetido a força ortopédica.

- Verificar se há diferença quantitativa dessas proteínas entre os animais fumantes e não fumantes em diferentes tempos de remodelação óssea.

## **4. MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1. Amostragem (Seleção dos Animais)**

Foram utilizados para este experimento 60 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, *albinus*) machos com 6 semanas de vida (jovens em desenvolvimento) pesando em média 180g. Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo – campus Ribeirão Preto. Este projeto foi submetido à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animal (CEEA – USP) e aprovado (2016.1.970.58.6). Durante todo o período experimental os animais foram alimentados com dieta padrão, constituída por ração moída (Labina – Purina) a fim de se evitar eventuais danos ao aparelho ortodôntico durante a mastigação; e água *ad libitum*. Animais machos foram utilizados para eliminar qualquer variabilidade hormonal devido ao ciclo reprodutivo feminino.

Durante o período experimental os animais permaneceram em gaiolas plásticas específicas para esse fim, com locais apropriados para a colocação de água e alimento, forradas com raspas de madeira (maravalha de pinus), ou seja, material totalmente inofensivo, atóxico, livre de peças pontiagudas, absorvente, isolante térmico, sem pó e não comestível pelos animais. Cada gaiola teve um número máximo de cinco animais. O período foi controlado com intervalos de dia-noite de 12 horas, para evitar alterações no ciclo metabólico e a temperatura da sala do biotério estava entre 21°C e 23°C, ideal para o crescimento e desenvolvimento dos animais. O local foi mantido constantemente arejado e limpo.

### **4.2. Delineamento Experimental**

Para cada período experimental (7°, 14° e 21° dias) foram utilizados cinco animais (n=5), distribuídos aleatoriamente de acordo com a Tabela 1.

**Tabela 1-** Grupos experimentais, tempos, número de animais e procedimentos propostos.

GRUPOS	DESCRIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS			Descrição
	7°	14°	21°	
Grupo Controle Negativo	5	5	5	Grupos sem expansão rápida da maxila e sem fumaça de cigarro (GC)
Grupo Experimental I	5	5	5	Animais sem expansão rápida da maxila e com fumaça de cigarro (FC)
Grupo Experimental II	5	5	5	Animais com expansão rápida da maxila e sem fumaça de cigarro (ERM)
Grupo Experimental III	5	5	5	Animais com expansão rápida da maxila e com fumaça de cigarro (ERM + FC)

### 4.3. Método

#### 4.3.1. Anestesia dos Animais

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

#### 4.3.2. Instalação e Ativação do Dispositivo Ortodôntico para a Disjunção da Sutura Palatina Mediana

O mecanismo de força utilizado foi constituído de uma mola passiva de 1,5 mm de largura, confeccionada com fio de aço inoxidável de 0,5 mm de diâmetro (Morelli®, Sorocaba, Brasil), colocada entre os incisivos superiores (Figura 1), semelhante ao apresentado na literatura (Sawada and Shimizu, 1996; Saito and Shimizu, 1997; Silva et al., 2012; Arnez et al., 2017) com o intuito de possibilitar a correta calibração e padronização da força empregada em todos os animais e permitir manter a disjunção da sutura palatina mediana.

Todos os dispositivos ortodônticos foram confeccionados e instalados pelo mesmo operador e assistente, seguindo sempre o mesmo protocolo. A superfície dos incisivos foi previamente preparada à montagem do dispositivo para a disjunção maxilar, com objetivo de aumentar a retenção e estabilizar a mola inserida entre os incisivos superiores. Em seguida foi realizada profilaxia dos incisivos com pasta de pedra-pomes misturada com água aplicada em taça de borracha (Viking®) em contra-ângulo adaptado ao micromotor (Dabi-Atlante®) por

15 segundos. Foi realizada a lavagem com spray (água-ar) e a secagem com ar proveniente da seringa tríplice, seguido de condicionamento do esmalte nos incisivos utilizando ácido ortofosfórico a 37% em forma de gel (3M®), durante 60 segundos, conforme recomendações do fabricante. Na sequência, nova lavagem e secagem das superfícies dentárias por 15 segundos. O agente de união (Primer e Bond 2.0 - Dentsply®) foi aplicado sobre a superfície condicionada do esmalte e fotopolimerizado com luz halógena por 20 segundos com auxílio do aparelho Heliomat II (Vigodent®). A resina fotopolimerizável (Transbond-ETM®) foi adaptada sobre o segmento de fio nas faces vestibular e distal recobrimo-o e, em seguida, foi induzida a polimerização por meio de luz halógena, com comprimento de onda de 470 nm (Heliomat II, Vigodent®) durante 30 segundos, dirigida em orientação oclusal, vestibular, mesial e distal de cada incisivo. Para compensar o desgaste decorrente do contínuo hábito roedor dos animais, várias camadas de resina foram fotopolimerizadas sobre o grampo. Após a ativação inicial, o aparelho não recebeu outra ativação adicional durante o experimento e seu correto posicionamento foi conferido diariamente, quanto à posição, à estabilidade e à necessidade de correções na eventualidade de estar causando injúrias à mucosa oral do animal.

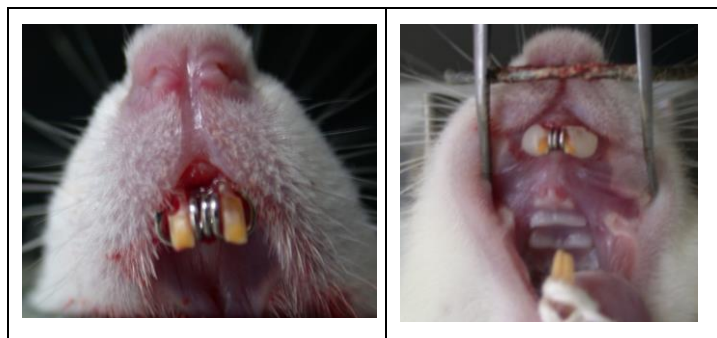


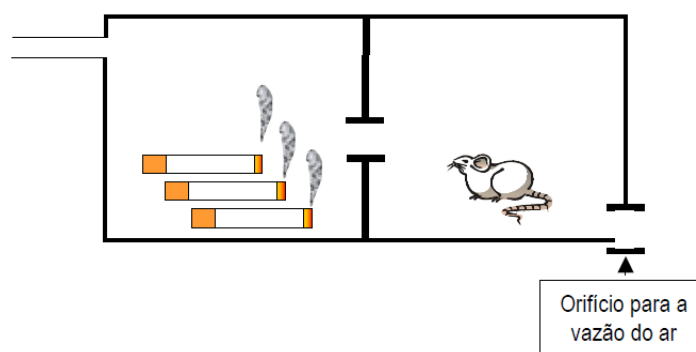
Figura 1 - Vista oclusal durante instalação de dispositivo ortodôntico entre os incisivos centrais.

#### 4.3.3. Exposição à fumaça de cigarro

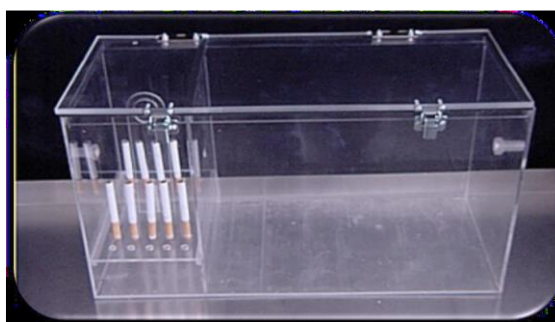
A metodologia utilizada para a exposição dos animais à fumaça foi descrita inicialmente por Le Mesurier et al. (1983) e posteriormente modificada (Nociti e cols. 2000). Trata-se de um recipiente de acrílico transparente, com dimensões de 45 X 25 X 20 cm<sup>3</sup>, composto por 2



câmaras interligadas por um orifício. Na primeira ficam armazenados os cigarros acesos. Nessa parte há também uma entrada por onde é bombeado ar, formando uma corrente que leva a fumaça para a segunda câmara, onde ficam os animais. Na segunda câmara há outro orifício que dá vazão ao ar bombeado (Figuras 2 e 3).



**Figura 2-** Desenho esquemático representando o mecanismo de exposição à fumaça. Observa-se a câmara 1 onde os cigarros serão posicionados e a câmara 2, onde os animais permanecerão durante a exposição à fumaça de cigarro.



**Figura 3-** Câmara de exposição à fumaça de cigarro.

Os animais expostos à fumaça de cigarro foram submetidos a um período de adaptação prévio de 3 semanas (21 dias).

Após a primeira e única ativação do mecanismo de força para ERM, os animais foram expostos à fumaça de 10 cigarros por três períodos diários de 8 minutos cada. Após o

intervalo de dias preconizado para cada grupo experimental, os animais foram submetidos à eutanásia, conforme cronograma estabelecido no delineamento experimental (Gráfico 1).

#### **4.3.4. Eutanásia dos animais, coleta e preparo dos espécimes**

Os procedimentos operatórios foram realizados na sala de cirurgia experimental do Biotério I da FORP-USP, sob condições de limpeza, anti-sepsia e desinfecção, com instrumentos esterilizados em autoclave. Ao término dos períodos experimentais, os animais sofreram eutanásia por uma injeção com sobredose de anestésico com Ketamina e Xilazina via intramuscular e, em seguida, foram decapitados. A maxila incluindo a sutura palatina mediana foi removida, dissecada e, imediatamente, conservada no freezer -80°. As peças para histologia foram fixadas em formol tamponado.

#### **4.4. Metodologias para avaliar a expressão gênica (RANK, RANKL e OPG)**

Os protocolos utilizados foram seguidos de acordo com Sambrook e Russel (2006) de uso comum na expressão gênica – Reação Quantitativa de Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qRT-PCR). Inicialmente os espécimes foram pesados para dar sequência às diversas etapas para posterior avaliação da expressão gênica.

##### **4.4.1. Análise da expressão gênica**

##### **Isolamento e avaliação do RNA total (Extração de RNA)**

O RNA total foi extraído da maxila dos animais (50-100mg) a partir da lise da suspensão de células mononucleares. Para isto as amostras de tecido ósseo foram inicialmente pulverizadas (maceradas) em grau com pistilo contendo nitrogênio líquido. A seguir os tecidos foram imersos em reagente Trizol (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad/CA, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, na proporção de 1 mL de Trizol para cada 1 mg de tecido, sendo agitado por 30 segundos e mantidos à temperatura ambiente por 5 minutos. As amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos, seguidas da adição de 0,2 mL de clorofórmio para cada mL de suspensão, e centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos, a 4°C, com formação de duas fases. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, ao qual foi

adicionado o mesmo volume de isopropanol, sofrendo agitação em vortex e incubado por 20 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  para precipitar o RNA da fase aquosa. Novamente os tubos foram centrifugados a  $10.000 \times g$ , por 10 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$  e, o precipitado foi lavado em etanol a 75% (v/v) e posteriormente seco à temperatura ambiente. As amostras de RNA foram suspensas em  $50 \mu\text{L}$  de água deionizada [estéril tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e livre de RNase], incubadas por 10 minutos a  $56^{\circ}\text{C}$ , e armazenadas no freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise. O RNA total isolado foi quantificado ( $A_{260\text{nm}}$ ) e foi avaliado o grau de pureza ( $A_{260}/A_{280}$ ) através de espectrofotometria (Sambrook e Russel, 2006).

### **Síntese do DNA complementar (cDNA)**

A síntese do cDNA foi obtida a partir do RNA total, por reação de transcrição reversa, com a utilização do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, CA, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. As amostras armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram descongeladas e mantidas em gelo. Novos tubos eppendorfs de  $0,1 \text{ mL}$  foram preparados com suas respectivas identificações para transcrição do cDNA. Utilizou-se  $2 \mu\text{g}$  de RNA total de cada amostra para a síntese do cDNA. Adicionou-se às amostras a quantidade recomendada pelo fabricante de cada componente do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (tampão RT, dNTP mix, primers, Multiscribe<sup>™</sup> transcriptase reversa e água livre de nuclease) para obtenção de um volume final de  $40 \mu\text{L}$ . A reação de transcrição reversa foi realizada em termociclador Veriti (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, CA, EUA). As amostras foram colocadas em placas adaptadas para termociclador programado para atingir as condições de ciclagem recomendadas pelo fabricante. As amostras foram incubadas a  $25^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos para ligação do *primer* ao RNA, seguida de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  por 2 horas para transcrição reversa, utilizando a enzima transcriptase reversa, e posterior incubação a  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 segundos para inativação da enzima e finalização do processo. Após a obtenção do cDNA, as amostras foram estocadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização do qRT-PCR.

### **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) após Transcrição Reversa ou PCR em tempo real (qRT-PCR)**

A reação da polimerase em cadeia tem por objetivo amplificar os cDNAs provenientes das diferentes amostras, obtendo *amplicons* (segmentos de cDNA gerado pelo processo de PCR)

em escala exponencial. Os cDNAs dos genes de interesse *Tnfrsf11a* (*Rank*), *Tnfsf11* (*Rankl*), *Tnfrsf11b* (*Opg*) e do gene constitutivo, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*), foram amplificados em aparelho para PCR em tempo real. As leituras de fluorescência foram realizadas pelo equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, CA, EUA). O *Gapdh* foi utilizado como gene de referência, a água destilada deionizada como controle negativo e RNA de uma das amostras foi adicionada aos *primers* ao invés de cDNA, para confirmar ausência de DNA genômico para os experimentos da reação de qRT-PCR.

As amplificações por PCR foram realizadas em duplicata utilizando placas de 96 poços. Para as reações de qRT-PCR foram utilizadas alíquotas de 10 ng de cDNA de cada amostra, que foram adicionadas à 10 µL de Taqman<sup>®</sup> Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, CA, EUA), 1 µL de TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays (*primers* e sondas específicos para cada gene de interesse) (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, CA, EUA), acrescido de quantidade necessária de água livre de RNase para obtenção de uma solução com volume final de 20 µL por poço.

Os *primers* e sondas do sistema TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays foram obtidos comercialmente e por serem propriedades privadas, as sequências não estão disponíveis. Os *primers* e sondas selecionados foram *Tnfrsf11b* (*Opg* - Rn00563499\_m1), *Tnfrsf11a* (*Rank* - Rn01426423\_m1), *Tnfsf11* (*Rankl* - Rn00589289\_m1) e o gene de referência *Gapdh* (*Gapdh* - Rn00667869\_m1).

Posteriormente, montou-se o *layout* das placas para as reações de qRT-PCR serem lidas no aparelho StepOne Plus<sup>®</sup> (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Foster City, CA, EUA), que realiza as reações de amplificação e detecção. Colocou-se 20 µL das diferentes amostras em cada poço da placa. As condições de amplificação das diferentes etapas da reação de qRT-PCR foram realizadas de acordo com as recomendações de tempo e temperatura propostas pelo fabricante (estágio 1: 95°C por 10 minutos para ativação da polimerase, estágio 2: 40 ciclos cada um com temperatura de 95°C por 15 segundos para desnaturação do DNA e 60°C por 1 minuto para anelamento do *primer* e polimerização).

Os dados foram analisados no *software* StepOne™ versão 2.3. Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura não relacionadas ao PCR, ou seja, flutuações decorrentes das variações de volume e evaporação ao longo da reação de PCR. Este programa quantifica as amostras por meio da análise da quantidade de fluorescência gerada pela liberação do fluoróforo 6-FAM aos produtos de amplificação durante o

curso da reação de PCR. Neste sistema, o fluoróforo 6-FAM foi utilizado como repórter na sonda Taqman. A liberação do fluoróforo acontece quando a enzima Taq DNA polimerase promove a extensão do *primer* e sintetiza a fita nascente de cDNA. Esta enzima apresenta atividade exonuclease 5', que degrada a sonda que está anelada à fita de cDNA. A degradação da sonda permite a liberação do fluoróforo (repórter), que emite o sinal fluorescente na cor azul (comprimento de onda de 495 nm a 521 nm).

Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar  $C_T$  (*cycle threshold*), que se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção. Os resultados individuais expressos em valores de  $C_T$  foram a seguir transferidos para planilhas e agrupados de acordo com os diferentes grupos de estudo e de período experimental, para a realização da análise estatística.

## **4.5. ANÁLISE DOS RESULTADOS**

### **4.5.1. PCR**

#### **Eficiência de amplificação**

A análise da curva de amplificação dos fragmentos obtidos pela reação de PCR em tempo real permitiu avaliar a análise quantitativa da expressão relativa de cada um dos genes investigados.

O estudo da eficiência foi realizado para cada primer, utilizando 3 ou 4 diluições seriadas da amostra (template). Com o intuito de avaliar a eficiência de amplificação de cada gene-alvo, foram realizadas diluições seriadas de cDNA para que fossem submetidas à amplificação nas mesmas condições acima citadas. O gráfico gerado pela concentração de cDNA e os respectivos valores de  $C_T$  foram empregados para o cálculo da equação de regressão e a correlação entre as variáveis pelo R-quadrado.

#### **Método $\Delta\Delta C_T$ (Livak; Schmittgen 2001)**

Este método foi validado para o cálculo da expressão relativa de todos os genes avaliados por meios dos primers utilizados no presente estudo (Livak & Schmittgen, 2001). No final dos ensaios de reação foi obtido o  $C_T$  do aumento da fluorescência ocorrido durante os ciclos de reação. Os dados ópticos foram analisados com o auxílio do programa 7500 System

Software. Para normalizar os valores de  $C_T$ , de forma a considerar diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, o  $C_T$  determinado para uma amostra foi subtraído do  $C_T$  do gene de referência da mesma amostra, gerando assim o  $\Delta C_T$ . Para cada gene, o cálculo de expressão relativa foi realizado a partir da diferença entre  $\Delta C_T$  das amostras e o  $\Delta C_T$  apresentado pelo controle ( $\Delta\Delta C_T$ ), com base na expressão do gene de referência.

A seguir foi calculado o  $\Delta\Delta C_T$  considerando como calibrador o grupo controle (C), no período de 3 dias. O cálculo  $\Delta\Delta C_T$  baseado na reação exponencial da PCR foi obtido a partir da expressão  $QR=2^{-\Delta\Delta C_T}$ , no qual QR representa o nível de expressão gênica relativa,  $C_T$  o ciclo de amplificação na qual cada amostra apresenta amplificação exponencial,  $\Delta C_T$  se refere à diferença entre  $C_T$  da amostra amplificada para o gene alvo e o  $C_T$  da mesma amostra amplificada para o gene de referência e  $\Delta\Delta C_T$  representa a diferença entre o  $\Delta C_T$  da amostra interesse e o  $\Delta C_T$  da amostra de referência-calibrador. A quantificação relativa foi utilizada para analisar alterações na expressão gênica em uma determinada amostra relativa à outra amostra de referência, isto é, uma amostra controle não tratada.

#### **4.6. Análise Estatística**

Os resultados do PCR em tempo real para cada gene foram agrupados de acordo com os diferentes grupos de estudo e de período experimental, e submetidos à análise de variância (Anova one-way e two-way) seguido pelo pós-teste de Tukey e Bonferroni. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p < 0.05$ .

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1 Radiografias**

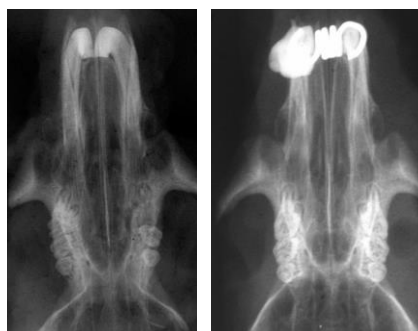
##### **5.1.1 Grupos Controles**

Todas as peças anatômicas foram radiografadas imediatamente após o sacrifício e para isso os filmes radiográficos oclusais foram posicionados paralelos à rafe palatina mediana, envolvendo toda a maxila. A radiografia oclusal dos grupos sem ERM apresentou a imagem dos molares e incisivos centrais superiores, presença de pontos de contatos proximais entre os dentes, bem como a presença da sutura palatina mediana, representada por uma linha radiolúcida fina, delimitada por lâmina dura caracterizada por linhas radiopacas definidas,

uniformes e eqüidistantes uma da outra. O osso trabecular apresentou aparência normal caracterizada pela imagem alternada de áreas radiolúcidas e finos tabiques radiopacos. As coroas dos incisivos superiores estavam em contato e mostravam paralelismo de raiz (Figura 4A).

### 5.1.2 Grupos experimentais

Na radiografia dos grupos submetidos à ERM foi visualizado um espaço radiolúcido, definido, nítido, correspondendo ao espaço sutural, porém mais amplo que no grupo controle. Foi observada a separação do ponto de contato entre os incisivos superiores, pois este espaço foi mantido pela largura méso-distal do dispositivo ortodôntico em posição mesmo nos períodos mais prolongados do experimento (21 dias). Este espaçamento interincisal foi mantido até o final do período experimental, confirmando os achados clínicos. As características da lâmina dura e do osso trabecular foram semelhantes aos animais que não foram submetidos à ERM (Figura 4B).



**Figura 4 - A:** Radiografia da sutura palatina mediana intacta. **B:** Radiografia de confirmação da abertura palatina mediana após ERM.

### 5.2 Avaliações clínicas

Os animais desenvolveram-se normalmente e não apresentaram qualquer desvio clínico durante o experimento. Quanto à variação de peso apresentada pelos animais, o peso inicial foi, em média, 180 gramas. Os animais dos Grupos Experimentais que foram sacrificados aos 21 dias ganharam peso durante o transcorrer do experimento até o momento do sacrifício (média de peso final ao redor de 285g), evidenciando que os procedimentos não resultaram em desconforto contínuo para os animais. Isto confirma que a mudança na consistência da ração (moída) destinada aos animais dos Grupos Experimental não foi prejudicial.

Durante avaliação clínica, pode-se notar que em todos os animais sem ERM a gengiva marginal livre apresentava-se sadia, sem sinais clínicos de inflamação ou ulceração. Não se observou separação dos pontos de contato entre os incisivos centrais, apenas na região cervical, onde estava presente a papila interdental.

Nos animais submetidos à ERM, após a remoção do aparelho ortodôntico que estava fixado nos incisivos centrais superiores, observou-se a demarcação do grampo sobre a mucosa fina, sem áreas de ulceração, porém com a presença de leve hiperplasia gengival. Observou-se ainda a separação do ponto de contato entre os incisivos superiores.

### 5.3 qRT-PCR

Observou-se diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo e tratamento quando foi analisada a expressão relativa dos RNAm dos genes *Tnfrsf11a* (Rank), *Tnfsf11* (Rankl) e *Tnfrsf11b* (Opg), ( $p < 0,05$ ). Abaixo foram descritos minuciosamente os resultados para cada gene de interesse envolvido no processo de remodelação óssea.

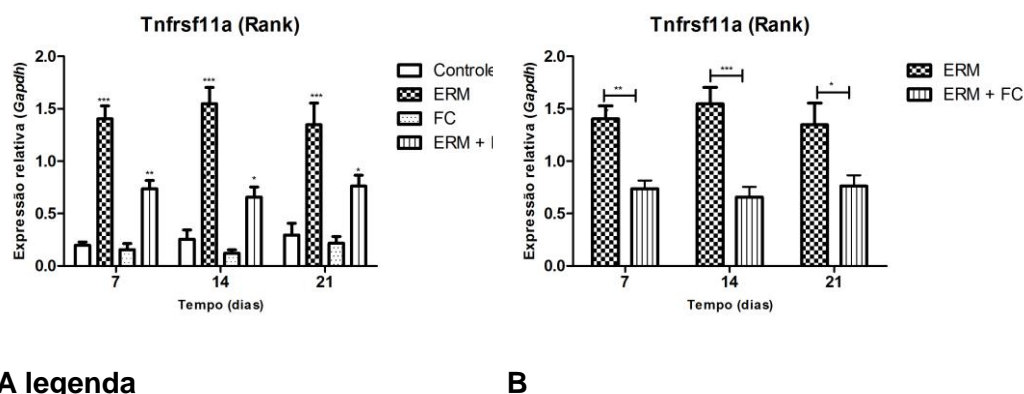
#### a) Expressão de RNAm de *Tnfrsf11a* (Rank)

Nos períodos analisados o grupo ERM apresentou maior expressão de mRNA para o gene *Tnfrsf11a* (Rank) quando comparado ao grupo Controle ( $p < 0,05$ ). O grupo ERM+FC também apresentou um aumento significativo em relação ao Grupo Controle ( $p < 0,05$ ). No grupo FC não houve diferença entre os tempos analisados quando comparado ao grupo Controle ( $p > 0,05$ ) (Figura 5A).

Ao se avaliar os dois grupos experimentais (ERM e ERM+FC) no grupo ERM observou-se maior expressão gênica estatisticamente significante em todos os períodos experimentais ( $p < 0,05$ ) (Figura 5B).

**Figura 5 - (A)** Expressão do RNAm do gene *Tnfrsf11a* (Rank) nos diferentes grupos em comparação ao grupo controle e **(B)** Comparação entre os dois grupos experimentais. Os gráficos mostram média, desvio padrão. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . \*\*\* $p < 0,001$ .



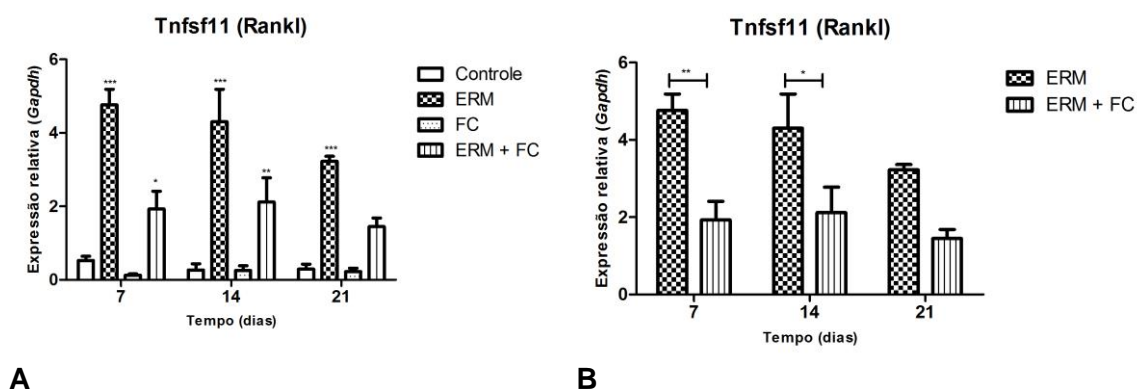


### b) Expressão de RNAm de *Tnfsf11 (Rankl)*

Na análise gênica, o grupo ERM apresentou maior expressão de mRNA para o gene *Tnfsf11 (Rankl)* quando comparado ao grupo Controle, FC e ERM+FC em todos os períodos, sendo este aumento significativo também em todos os períodos quando comparado ao grupo Controle ( $p < 0,001$ ). No período de 21 dias, observou-se que o grupo ERM apresentou uma redução na expressão gênica quando comparado aos outros tempos experimentais, porém ainda houve aumento significativo comparado ao seu controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 6A).

A avaliação dos dois grupos experimentais (ERM e ERM+FC) indicou um aumento na expressão gênica de *Rankl* para o grupo ERM em todos os tempos estudados, sendo este aumento significativo aos 7 dias ( $p < 0,05$ ) (Figura 6B).

**Figura 6 - (A)** Expressão do RNAm do gene *Tnfsf11 (Rankl)* nos diferentes grupos em comparação ao grupo controle e **(B)** Comparação entre os dois grupos experimentais. Os gráficos mostram média, desvio padrão. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . \*\*\* $p < 0,001$ .

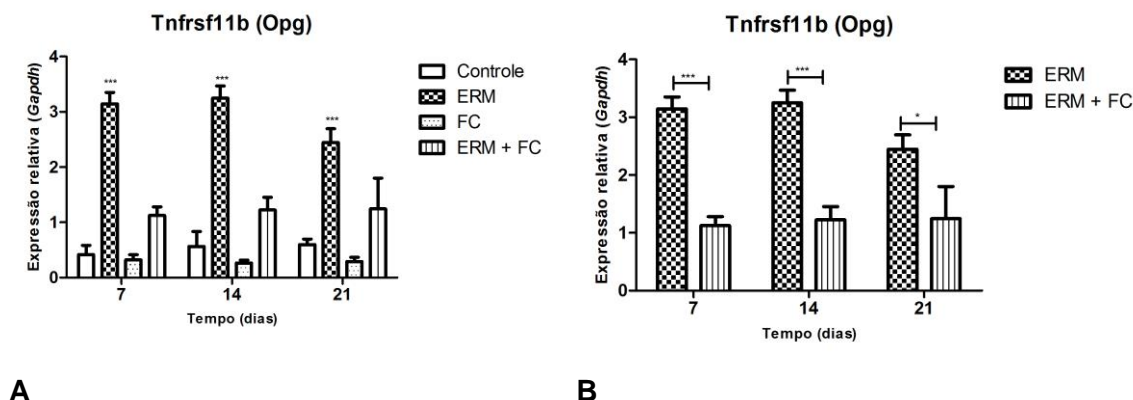


### c) Expressão de RNAm de *Tnfrsf11b (Opg)*

O grupo ERM apresentou um estímulo na expressão de RNAm para o gene *Tnfrsf11b* (*Opg*) quando comparado aos demais grupos nos períodos de 7 e 21 dias de estudo ( $p < 0,001$ ) (Figura 7A).

Quando se comparou os dois tipos de grupos experimentais, pode-se observar uma maior expressão de RNAm para *Opg* no grupo ERM comparado ao grupo ERM+FC com significância estatística a partir dos 7 dias de avaliação (Figura 7B).

**Figura 7** - (A) Expressão do RNAm do gene *Tnfrsf11b* (*Opg*) nos diferentes grupos em comparação ao grupo controle e (B) Comparação entre os dois grupos experimentais. Os gráficos mostram média, desvio padrão. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . \*\*\* $p < 0,001$ .



## 6 Discussão

Embora as campanhas anti-fumo sejam promovidas constantemente por diversos órgãos de saúde, ainda é significativa a parcela da população que possui o hábito de fumar. Além de ser a causa de muitas doenças fatais e mortes prematuras em diversos países (Doll et al., 2004), a fumaça do cigarro tem efeitos prejudiciais no sistema imunológico (Wong et al., 2007; Stampfli e Anderson, 2009) e é extremamente nociva em virtude dos 50 componentes conhecidamente carcinogênicos que a constituem (Oberg et al., 2011). É descrito na literatura o prejuízo causado no processo de reparo tecidual por alguns elementos da fumaça de cigarro como a nicotina, o monóxido de carbono e o cianeto (Silverstein, 1992; Haverstoch e Mandracchia, 1998), bem como o efeito negativo observado *in vitro* pela ação da acroleína e do acetaldeído na proliferação e adesão de células importantes para o processo de cicatrização, como os fibroblastos (Cattaneo et al., 2000). Considerando-se que a remodelação periodontal resultante da movimentação dentária envolve o recrutamento de

diversos mediadores inflamatórios (Hughes, 2000; Garlet et al., 2007), é razoável acreditar que mudanças na resposta ao tratamento ortodôntico/ortopédico devam ocorrer em pacientes expostos à inalação da fumaça de cigarro.

A ERM ou disjunção maxilar é um procedimento ortopédico que visa tratar a mordida cruzada posterior dental, esquelética ou associação de ambas, além de ser indicada para corrigir diversas discrepâncias antero-posteriores associadas ou não a mordida cruzada posterior. A prevalência de mordida cruzada varia em torno de 3% a 24% (Reddy et al., 2013; Carvalho et al., 2013; Kumar et al., 2013). É importante que seja realizada correção ortodôntica precoce neste tipo de maloclusão, pois há prejuízo do crescimento e desenvolvimento crânio-maxilo-facial (Ong et al., 2013; Zandi et al., 2014). O conhecimento e o entendimento sobre as alterações provocadas pela inalação da fumaça de cigarro no processo de remodelação óssea associado à instalação de forças mecânicas ainda é extremamente escasso e complexo, o que torna os efeitos do tratamento ortodôntico destes pacientes bastante imprevisível.

Dessa forma, foi realizada neste estudo a avaliação dos principais mediadores moleculares envolvidos no processo de remodelação óssea após ERM em ratos submetidos à inalação da fumaça de cigarro. A utilização de ratos como animais de estudo oferece a oportunidade de avaliar o processo de remodelação óssea intramembranosa em diversas condições patológicas, além de proporcionar menos interferências de fatores de confusão, que podem estar presentes em humanos.

O modelo de remodelação óssea utilizado neste estudo, associado à ERM *in vivo*, foi previamente descrito na literatura (Sawada e Shimizu, 1996; Saito e Shimizu, 1997; Silva et al., 2012; Arnez et al., 2017) e demonstrou ser um sistema efetivo para a separação maxilar na sutura palatina mediana, por isso foi utilizado para avaliar os efeitos da fumaça de cigarro passiva sobre a remodelação e neoformação óssea. O tempo de 3 semanas de exposição prévia à fumaça a que os animais foram submetidos, anterior à realização de ERM, foi definido com o objetivo de avaliar os efeitos crônicos da fumaça no metabolismo ósseo, tendo em vista que o *turnover* ósseo dos roedores dura em torno de 21 dias para ocorrer.

O procedimento de ERM é empregado para correção da mordida cruzada posterior, em que se observa o afastamento dos ossos palatinos em direção lateral, a abertura da sutura palatina mediana e o aparecimento de um diastema entre os incisivos centrais superiores. As forças mecânicas são transmitidas para o microambiente da matriz extracelular, levando à modificações na membrana celular, citoesqueleto, síntese de proteínas da matriz nuclear e alterações no padrão de expressão gênica (Krishnan e Davidovitch, 2006). As mudanças na expressão gênica frente a forças mecânicas podem modular positiva ou negativamente a

viabilidade, proliferação e a diferenciação celular, que são essenciais para o mecanismo de movimentação ortodôntica (Meikle, 2006).

As células eucarióticas expressam informações genéticas baseada no princípio fundamental da biologia molecular. Este princípio consiste no fato de que uma sequência de nucleotídeos de uma região específica da molécula de DNA em um cromossomo é inicialmente copiada sob a forma de RNA durante o processo de transcrição. As cópias de RNA, chamadas de moléculas de RNAm, provenientes de segmentos de DNA, são utilizadas como moldes para a síntese proteica durante o processo de tradução. A transcrição do DNA em RNAm dos eucariotos é realizada pela enzima RNA polimerase II. Os RNAm processados dentro do núcleo são transportados para o citoplasma celular e, após maturação, são traduzidos em proteínas pelos ribossomos. A transcrição e a tradução são os meios pelos quais se estuda a expressão gênica das diferentes células (Alberts et al., 2010).

O padrão de expressão gênica celular pode ser alterado em resposta a mudanças em seu meio ambiente. Uma célula pode regular a expressão de cada um de seus genes de acordo com a sua necessidade, por meio do controle da produção de seus RNAs ou pela capacidade de alterar seus níveis proteicos (Alberts et al., 2010). Contudo, é necessário esclarecer que o RNAm de genes estimulados ou inibidos nem sempre correspondem ao mesmo perfil proteico. A expressão gênica pode ser regulada em diferentes etapas no caminho que vai do DNA ao RNA até a produção de proteínas. Há uma complexidade de eventos que podem modular a expressão de diferentes genes e proteínas nas células. Desta maneira, torna-se importante enfatizar que existem diversos mecanismos para regulação da expressão gênica, tais como (1) controle transcricional (controlando quando e como um determinado gene pode ser transcrito), (2) controle pós-transcricional, isto é, controle do processamento de RNA, transporte de RNA e controle da sua localização no citoplasma, (3) controle traducional, (4) controle da degradação do RNAm e (5) controle da atividade proteica (Alberts et al., 2010).

Num primeiro momento foi realizada análise comparativa dos Grupos Experimentais (ERM, ERM+FC) em relação aos Grupos Controles (GC, FC). Em segunda análise, os valores de expressão gênica do grupo ERM foram comparados aos do grupo ERM+FC.

Quando considerada a expressão gênica da tríade *Rank/Rankl/Opg*, houve aumento significativo para *Rank* e *Rankl* em todos os períodos avaliados do grupo ERM, enquanto que para *Opg* o aumento observado foi significativo aos 7 e 21 dias quando comparados ao GC. No grupo ERM+FC também foi observada maior expressão gênica de *Rank* e *Rankl*, embora de menor magnitude, em todos os períodos avaliados para *Rank* e *Rankl* em comparação ao GC. Observa-se por meio destes dados que o estímulo gênico para reabsorção óssea ocorre

durante todo o período de reparo e é mais expressivo no grupo de animais que não foi exposto à fumaça, enquanto que o estímulo gênico para evitar reabsorção óssea foi observado apenas no grupo ERM em períodos iniciais e tardios do processo de reparo.

A comparação entre os grupos ERM e ERM+FC indicou maior expressão gênica de *Rank* em todos os períodos de tempo avaliados, maior expressão de *Rankl* aos 7 dias, e para *Opg* o estímulo gênico ocorreu aos 7 e 21 dias nos animais que não foram expostos à fumaça de cigarro. Mais uma vez a fumaça de cigarro pareceu prejudicar a sinalização de genes relacionados ao processo de reabsorção óssea.

Alguns autores avaliaram a expressão de genes osteogênicos durante a estimulação mecânica contínua em células mesenquimais e progenitoras humanas em culturas osteogênicas diferenciadas e indiferenciadas aos 7 e 14 dias de estudo. Neste estudo observaram que a estimulação mecânica aumentou a expressão de genes osteogênicos como colágeno, *Onc*, *Opn*, *Bmp-2* e *Occ* aos 7 e 14 dias. Além disso, a estimulação mecânica mostrou um aumento significativo de cálcio depositado e de atividade de fosfatase alcalina (ALP) no grupo de células diferenciadas com estímulo mecânico aos 7 e 14 dias. Estes autores concluíram que o estímulo mecânico induziu o aumento da expressão de marcadores osteogênicos precoces e tardios em células diferenciadas osteogênicas (Lohberger et al., 2014). Tais achados confirmam os resultados encontrados nesta pesquisa. O estímulo de disjunção aplicado em sutura palatina mediana de ratos resultou em aumento na expressão de todos esses genes osteogênicos em períodos precoces e tardios do processo de reparo ósseo.

A influência negativa da fumaça de cigarro na sinalização gênica dos diversos mediadores que modulam a formação óssea foi bastante consistente neste estudo, e vai de encontro a dados prévios em que se observou que a fumaça de cigarro inibiu a proliferação de células osteoprogenitoras humanas em células tipo osteoblasto (Liu et al., 2001). Boa parte da influência negativa da fumaça de cigarro sobre o reparo ósseo tem sido atribuída à nicotina, substância altamente citotóxica e que está presente em maior quantidade na fumaça resultante da queima do cigarro (Giorgetti et al., 2012; Santiago et al., 2017). Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram o efeito inibitório da nicotina na diferenciação dos osteoblastos (Ramp et al., 1988; Pinto et al., 2002; Henemyre et al., 2003, Tanaka et al., 2007; Zhou et al., 2013; Shintcovsk et al., 2014). A avaliação *in vitro* do efeito de altas doses de nicotina sobre a atividade de células precursoras de medula óssea humana culminou em redução na expressão gênica de *Bmp-2* e *Ocn*, o que denota prejuízo no processo de proliferação e diferenciação osteogênica (Shen et al., 2013). Da mesma forma, a administração de altas

doses de nicotina em cultura de células do tipo osteoblasto de coelho demonstrou efeito inibitório na expressão gênica de *Bmp-2*, assim como em outros mediadores osteogênicos e angiogênicos, reforçando o papel nocivo da nicotina sobre a atividade osteoblástica (Ma et al., 2011). Em células humanas do ligamento periodontal, o tratamento com nicotina também levou à redução da expressão gênica de alguns marcadores de diferenciação osteoblástica como fosfatase alcalina, osteopontina e osteocalcina (Lee et al., 2009).

O receptor ativador do Fator Nuclear Kappa B (RANK), o ligante de RANK (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG) fornecem a base celular e molecular para o *cross-talk* entre osteoblasto e osteoclasto, células cruciais no processo de remodelação óssea (Horowitz et al., 2001). O RANK, que pertence à superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), está presente na superfície dos precursores de osteoclastos e é ativado pelo RANKL. Esta interação induz a diferenciação de monócitos em osteoclastos, assim iniciando o processo de reabsorção. O sistema RANK/RANKL/OPG controlam o processo de remodelação e fazem parte do metabolismo ósseo. O RANKL é um agonista que regula aspectos importantes dos osteoclastos como diferenciação, fusão, sobrevivência, ativação e apoptose. Uma vez que ativação de RANK por RANKL inicia o processo de reabsorção óssea, este mediador solúvel pode ser considerado um marcador de reabsorção óssea. Por outro lado, a OPG, também membro da superfamília do TNF, é um receptor solúvel secretado, que é um antagonista do RANKL, uma vez que interrompe esta ativação pela ligação direta ao RANKL evitando o processo de reabsorção óssea, isto é, a OPG regula negativamente o processo de osteoclastogênese (Horowitz et al., 2001).

No presente estudo, observamos nos grupos ERM e ERM+FC um estímulo gênico de *Rank* em todos os períodos de tempo avaliados, em relação ao GC. A comparação entre os grupos ERM e ERM+FC indicou maiores níveis de expressão gênica de *Rank* em todos os períodos avaliados para o grupo de animais que não foi exposto à fumaça de cigarro. Além disso, no grupo ERM+FC foi observada inibição gênica de *Rankl* aos 7 dias comparado ao grupo ERM. Quando comparados ao GC, todos os períodos de ERM indicaram estímulo gênico de *Rank*. Para a osteoprotegerina no grupo ERM, houve estímulo gênico aos 7 e 21 dias em relação ao GC e ao grupo ERM+FC. Estes resultados nos levam a acreditar que em todos os períodos avaliados há um estímulo gênico para promover a reabsorção óssea nos grupos de animais submetidos à ERM, e que esse estímulo gênico foi prejudicado nos grupos que também foram submetidos à inalação de fumaça – ERM+FC. Ainda, é possível supor que estímulo gênico para evitar a reabsorção óssea só acontece em períodos mais tardios e apenas nos animais que foram submetidos à ERM, mas não à inalação de fumaça.

O aumento de *Rank*, *Rankl* e *Opg* observado no grupo ERM coincide com dados encontrados na literatura. Arnez e colaboradores (2017) avaliaram a sinalização osteoclastogênica em região de sutura palatina de ratos após realização de ERM. Constataram que houve aumento na expressão de *Rank* e *Rankl* durante o período inicial de reparo ósseo e aumento de *Opg* nos períodos intermediários do reparo. A ERM é rotineiramente utilizada para o tratamento de constrição maxilar e este procedimento induz um estresse mecânico capaz de promover remodelação óssea na região de sutura palatina. Considerando-se que a remodelação de osso alveolar consiste na interação entre reabsorção óssea promovida por osteoclastos e formação óssea induzida por osteoblastos, é bastante razoável atribuir as variações de expressão gênica de *Rank/Rankl/Opg* ao trauma resultante da ERM. A relação gênica de *Rankl* e *Opg* (razão *Rankl/Opg*) tem o intuito de mostrar se o metabolismo ósseo estava mais direcionado para a formação ou reabsorção óssea. Os dados do presente estudo demonstraram um aumento na razão *Rankl/Opg* nos períodos iniciais de reparo para o grupo ERM quando comparado ao GC, o que pode sinalizar o predomínio de atividade osteoclástica nesta fase precoce de reparo e inflamação. Observou-se também a presença de células inflamatórias – neutrófilos (polimorfonucleares) e mononucleares, compatível com a situação de trauma gerada pela ERM, e que irá colaborar para o início do processo de deposição óssea por meio do recrutamento de diversos fatores de crescimento e citocinas. Conforme descrito na literatura, a movimentação ortodôntica promove sítios de inflamação ao redor do ponto de aplicação da força, com consequente infiltrado de fatores de crescimento e citocinas, como Tnf e interleucina-1, que são mediadores inflamatórios importantes envolvidos no reparo ósseo e na ativação de genes envolvidos no processo de remodelação óssea (Garlet et al., 2007).

A movimentação dentária em ratos resultou em aumento da expressão de *Rankl* no tecido periodontal (Nakano et al., 2011). Em outro estudo, foi demonstrado que células do ligamento periodontal podem regular a osteoclastogênese por meio de atividade estimulatória via *Rankl* e inibitória via *Opg* (Kanzaki et al., 2001). Tais resultados suportam os achados da presente pesquisa, visto que a expressão de *Rankl* foi estimulada em áreas da sutura palatina de ratos submetidas à tensão pelo procedimento de ERM. Em consequência, houve provável aumento da atividade osteoclástica que resultou em remodelação óssea. O aumento na expressão de *Opg* ocorrido em períodos intermediários e tardios de reparo parece estar relacionado com a redução de atividade osteoclástica, o que denota um papel importante deste mediador no processo de formação óssea.

Com relação ao efeito da exposição à fumaça de cigarro, a avaliação da expressão gênica de mediadores relacionados à reabsorção óssea em células do ligamento periodontal humano tratadas com nicotina demonstrou redução na expressão de *Opg* e aumento na expressão de *Rankl*, o que sugere estímulo para o processo de reabsorção óssea no padrão de atividade destas células (Lee et al., 2009). Da mesma forma, células de ligamento periodontal de 3 pacientes submetidos a extração de 1º pré-molar foram coletadas e cultivadas em meio de cultura, com acréscimo de nicotina por 72 horas (Li-Zheng et al., 2013). Por meio de metodologia de PCR *real-time*, este estudo constatou maiores níveis de expressão gênica para *Rankl* após exposição destas células à nicotina, enquanto que houve inibição da expressão de *Opg*, resultando numa razão *Rankl/Opg* direcionada para a reabsorção óssea. Esses achados da literatura concordam em parte com o presente estudo, pois houve efeito inibitório na expressão de *Opg* no grupo de animais submetido à ERM+FC. Porém, nestes mesmos animais, não foi observado aumento na expressão de *Rankl* em consequência da exposição à fumaça de cigarro. Houve aumento de *Rankl* no grupo ERM+FC quando comparado ao grupo controle em virtude do trauma da disjunção. A comparação do grupo ERM com o grupo ERM+FC demonstrou que a exposição à fumaça de cigarro inibiu a expressão de *Rankl*. Considerando-se que o presente estudo foi realizado *in vivo*, é provável que a modulação da atividade desses genes esteja submetida a um complexo sistema regulador, enquanto que avaliações *in vitro* caracterizam respostas de células isoladas, que não estão sob a influência de outros fatores regulatórios inerentes a um organismo em funcionamento. Além disso, a expressão gênica celular nesses estudos *in vitro* foi avaliada com relação ao efeito da nicotina, que é o componente majoritário da fumaça de cigarro, mas não exclusivo. No presente trabalho, os animais foram expostos à fumaça de cigarro e todas as substâncias nocivas que a constituem, o que poderia justificar a diferença de resposta na expressão gênica observada.

A exposição de células humanas precursoras osteoclásticas a diferentes concentrações de nicotina evidenciou um aumento no número de osteoclastos mononucleados e redução na quantidade de osteoclastos multinucleados, além de inibição na expressão gênica de alguns mediadores de atividade osteoclástica (Tanaka et al., 2013). Estes dados estão de acordo com os achados do presente estudo.

A administração sistêmica de nicotina por meio de injeções intraperitoniais durante 3 dias consecutivos em camundongos acelerou a destruição de osso alveolar após indução de periodontite (Kubota et al., 2016). Em níveis moleculares, esses autores detectaram aumento na expressão gênica de *Rankl* 7 dias após a indução de periodontite nos linfonodos



submandibulares dos camundongos submetidos às injeções de nicotina. Em nosso estudo foi observado efeito contrário da nicotina, tendo em vista que o grupo de animais submetidos ao procedimento de disjunção e expostos à fumaça de cigarro apresentou menores valores de expressão de *Rankl* comparado aos animais submetidos apenas à disjunção, embora tais níveis tenham sido maiores em relação aos do grupo controle. Considerando-se que o quadro de periodontite caracteriza-se pela ação bacteriana associada à destruição periodontal, é possível que a atividade das bactérias envolvidas nessa patologia tenha colaborado para a maior extensão de reabsorção óssea e, sendo assim, ao aumento da expressão gênica de *Rankl* observado. Além disso, o modelo de injeções intraperitoniais de nicotina certamente deve desencadear vias de resposta diferente daquelas observadas em nosso modelo experimental, em que os animais foram expostos à inalação de fumaça de cigarro.

O efeito prejudicial da nicotina sobre a perda óssea em modelos de inflamação periodontal induzidas já está bem estabelecido na literatura (Nociti et al., 2000; Chang et al., 2003; Laxman e Annaji, 2008; Liu et al., 2010). Em virtude da escassez de trabalhos que relacionem movimentação dentária neste tipo de modelo, Kirschneck e colaboradores (2015) avaliaram o efeito da aplicação de forças ortodônticas sobre a perda óssea periodontal induzida pela nicotina. A análise *in vivo* demonstrou que a aplicação de forças para mesializar o molar superior esquerdo de ratos resultou em aumento da síntese de enzimas inflamatórias, além de proteínas e citocinas envolvidas com o processo de reparo tecidual no ligamento periodontal. A associação de força ortodôntica à injeções subcutâneas diárias de nicotina resultou em aumento mais significativo de enzimas inflamatórias e citocinas, bem como em aumento na razão *Rankl/Opg* e consequente estímulo da diferenciação osteoclástica. Os autores observaram uma resposta periodontal exacerbada nos grupos em que houve movimentação dentária e exposição à nicotina, com maior perda de osso alveolar após aplicação da força ortodôntica. Extrapolando para a prática clínica, sugeriram que o ortodontista deve estar ciente que pacientes fumantes apresentam maior potencial de perda óssea periodontal durante o tratamento, e recomendaram que o hábito de fumar seja interrompido uma vez que se inicie a movimentação ortodôntica. Em nosso estudo, o estímulo de força aplicada foi de tração, e não de compressão, ainda assim foi observado aumento na razão de *Rankl/Opg* nos períodos iniciais de reparo em animais expostos à fumaça de cigarro.

A exposição à fumaça de cigarro causou prejuízo consistente na expressão gênica da maioria dos mediadores ósseos avaliados neste estudo. No entanto, futuras investigações são necessárias para elucidar os mecanismos moleculares pelos quais a fumaça de cigarro atua

no organismo, bem como as vias de sinalização envolvidas no processo de remodelação óssea sob tais circunstâncias.

## 7 CONCLUSÃO

A partir do presente estudo pode-se concluir que:

Houve estímulo à osteoclastogênese nos grupos submetidos à ERM, com menor magnitude naquele que também foi exposto à fumaça de cigarro. Os marcadores de osteogênese foram estimulados nos animais submetidos à ERM, durante todos os períodos avaliados.

## 8 REFERÊNCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5<sup>a</sup> ed. Nova York: Garland Science, 2008.
- Amorim FPLG, Ornellas SS, Diniz SF, Batista AC, Silva TA. Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetics rats. *J Mol Hist.* 2008; 39(4):401-8.
- Arnez MFM, Ribeiro LSN, Barretto GD, Monteiro PM, Ervolino E, Stuani MBS. RANK/RANKL/OPG expression in rapid maxillary expansion. *Br Dent J.* 2017; 28(3):296-300.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 15:337-42.
- Camozzi V, Tossi A, Simoni E, Pagani F, Francucci CM, Moro L. Role of biochemical markers of bone remodeling in clinical practice. *J Endocrinol Invest.* 2007; 30(6):13-7.
- Carvalho AC, Paiva SM, Viegas CM, Scarpelli AC, Ferreira FM, Pordeus IA. Impact of malocclusion on oral health-related quality of life among Brazilian preschool children: a population-based study. *Braz Dent J.* 2013; 24:655-61.
- Cattaneo V, Celta G, Rota C, Vezzoni F, Gallanti A. Volatile components of cigarette smoke: effect of acrolein and acetaldehyde on human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 2000; 71(3):425-32.
- Chang Y, Tsai C, Yang S et al. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression in human gingival fibroblasts stimulated with nicotine. *J Periodontal Res.* 2003; 38:496-501.
- Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 2004; 22(4):233-41.
- Collett AR, Mather JC, Phillips M. Smoking patterns in adolescent orthodontic patients and school children. *Aust Orthod J.* 1999; 15(5):276-83.
- Cox G, Einhorn TA, Tzioupis C, Giannoudis PV. Bone turnover markers in fracture healing. *J Bone Joint Surg Br.* 2010; 92-B:329-34.
- Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 years observations on male British doctors. *Br Med J.* 2004; 328:1519.

- Elias LS, Costa RF, Carvalho MA, Batista AC, Silva TA, Leles CR, Mendonça EF. Markers of bone remodeling in neoplastic and bone-related lesions. *Oral Surg Oral Med Patol Oral Rad Endo*. 2010; 110(5):624-31.
- Ehrlich PJ, Lanyon LE. Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporos Int*. 2002; 13:688-700.
- Garlet TP, Coelho U, Silva JS, Garlet GP. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J Oral Sci*. 2007; 115:355-362.
- Giorgetti APO, César Neto JB, Casati MZ, Sallum EA, Nociti Junior FH. Cigarette smoke inhalation influences bone healing of post-extraction tooth socket: a histometric study in rats. *Braz Dent J*. 2012; 23(3):228-34.
- Grossi SG, Skrepcinski FB, DeCaro T, Zambon JJ, Cummins D, Genco RJ. Response to periodontal therapy in diabetics and smokers. *J Periodontol*. 1996; 67(10):1094-102.
- Haverstoch BD, Mandracchia VJ. Cigarette smoking and bone healing: implications in foot and ankle surgery. *J Foot Ankle Surg*. 1998; 37(1):69-74.
- Henemyre CL, Scales DK, Hokett SD, Cuenin MF, Peacock ME, Parker MH et al. Nicotine stimulates osteoclast resorption in a porcine marrow cell model. *J Periodontol*. 2003; 74(10):1440-6.
- Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001; 12:9-18.
- Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol*. 2000; 41:48-72.
- Ishijima M, Rittling SR, Yamashita T, Tsuji K, Kurosawa H, Nifuji A, et al. Enhancement of osteoclastic bone resorption and suppression of osteoblastic bone formation in response to reduced mechanical stress do not occur in the absence of osteopontin. *J Exp Med*. 2001; 193:399-404.
- Ivanovski S, Li H, Haase HR, Bartold PM. Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodont Res*. 2001; 36:131-41.
- Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. *J Dent Res*. 2001; 80:887-91.
- Kirkanydes S, O'banion MK, Subtelny JD. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in orthodontic tooth movement: Metalloproteinase activity and collagen synthesis by endothelial cells. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2000; 118:203-9.
- Kirschneck C, Proff P, Maurer M, Reicheneder C, Römer P. Orthodontic forces add to nicotine-induced loss of periodontal bone. An in vivo and in vitro study. *J Orofac Orthop*. 2015; 76:195-212.
- Klaassen CD. Agentes tóxicos ambientais não-metálicos. Poluentes atmosféricos, solventes e vapores pesticidas. In: Goodman & Gilman, As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9 Ed. Rio de Janeiro: Mcgraw – Hill Interamericana; 1240-1257, 1996.
- Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006; 129:1-32.
- Kubota M, Yanagita M, Mori K, Hasegawa S, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. The effects of cigarette smoke condensate and nicotine on periodontal tissue in a periodontitis model mouse. *PLoS one*. 2016; 11(5):e0155594.
- Kumar P, Londhe SM, Kotwal A, Mitra R. Prevalence of malocclusion and orthodontic treatment need in schoolchildren - An epidemiological study. *Med J Armed Forces India*. 2013; 69(4):369-74.
- Laxman VK, Annaji S. Tobacco use and its effects on the periodontium and periodontal therapy. *J Contemp Dent Pract*. 2008; 9:97-107.
- Le Mesurier SM, Stewart BW, Lykke AW. Injury to type-2 pneumocytes in rats exposed to cigarette smoke. *Environ Res*. 1981; 24(1):207-17.
- Lee HJ, Pi SH, Kim Y, Kim HS, Kim SJ, Kim YS, Lee SK, Kim EC. Effects of nicotine on antioxidant defense enzymes and RANKL expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontol*. 2009; 80(8):1281-8.
- Liu XD, Zhu YK, Umino T, Spurzem JR, Romberger DJ, Wang H. Cigarette smoke inhibits osteogenic differentiation and proliferation of human osteoprogenitor cells in monolayer and three-dimensional collagen gel culture. *J Lab Clin Med*. 2001; 137(3):208-19.

- Liu Y, Wu L, Wang J et al. Micro-computerized tomography analysis of alveolar bone loss in ligature- and nicotine-induced experimental periodontitis in rats. *J Periodontol Res.* 2010; 45:714-719.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) method. *Methods.* 2001; 25(4):402-8.
- Li-Zheng W, Duo-Mo D, Ying-Feng L, Xin G, Zhi-Fei Z, Xiao-Jing W. Nicotine favors osteoclastogenesis in human periodontal ligament cells co-cultured with CD4+T cells by upregulating IL-1 $\beta$ . *Int J Molec Med.* 2013; 31:938-42.
- Lohberger B, Kaltenecker H, Stüendl N, Payer M, Rinner B, Leithner A. Effect of cyclic mechanical stimulation on the expression of osteogenesis genes in human intraoral mesenchymal stromal and progenitor cells. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:1-10.
- Luan X, Ito Y, Holliday S, Walker C, Daniel J, Galang TM, Fukui T, Yamane A, Begole E, Evans C, Diekwisch TG. Extracellular matrix-mediated tissue remodeling following axial movement of teeth. *J Histochem Cytochem.* 2007; 55:127-40.
- Ma L, Zwahlen RA, Zheng LW, Sham MH. Influence of nicotine on the biological activity of rabbit osteoblasts. *Clin Oral Implants Res.* 2011; 22(3):338-42.
- Marinucci L, Bodo M, Balloni S, Locci P, Baroni T. Sub-toxic nicotine concentrations affect extracellular matrix and growth factor signaling gene expressions in human osteoblasts. *J Cell Physiol.* 2014; 229(12):2038-48
- Masella RS, Meister M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006; 129:458-68.
- Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod.* 2006; 28:221-40.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer - INCA. Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2002.
- Mosely LH, Finseth F. Cigarette smoking: impairment of digital blood flow and wound healing in the hand. *Hand.* 1977; 9(2):97-101.
- Moyers RE. *Ortodontia.* 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. 483p.
- Nakagawa M, Kukita T, Nakasima A, Kurisu K. Expression of the type I collagen gene in rat periodontal ligament during tooth movement as revealed by in situ hybridization. *Arch. Oral Biol.* 1994; 39:289-94.
- Nakano Y, Yamaguchi M, Fujita S, Asano M, Saito K, Kasai K. Expressions of RANKL/RANK and M-CSF/c-fms in root resorption lacunae in rat molar by heavy orthodontic force. *Eur J Orthod.* 2011; 33:335-43.
- Nociti FH Jr, Nogueira-Filho GR, Primo MT et al. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. *J Periodontol.* 2000; 71:1460-4.
- Nociti FH Jr, César NJ, Carvalho MD, Sallum EA. Bone density around titanium implants may be influenced by intermittent cigarette smoke inhalation – A histometric study in rats. *Int J Oral Max Impl.* 2002; 17(3):347-52.
- Nomura S, Takano-Yamamoto T. Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol.* 2000; 19:91-6.
- Öberg M, Jaakkola MS, Woodward A, Peruga A, Prüss-Üstün A. Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: A retrospective analysis of data from 192 countries. *Lancet.* 2011; 377(9760):139-46.
- Ong SC, Khanbay BS, McDonald JP et al. The novel use of three-dimensional surface models to quantify end visualized the immediate changes of the mid-facial skeleton following rapid maxillary expansion. *Surgeon.* 2013; 13:1-7.
- Ramp WK, Lenz LG, Galvin RJ. Nicotine inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity, but stimulates DNA synthesis in osteoblast-like cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1988; 197(1):36-43.
- Reddy ER, Manjula M, Sreelakshmi N, Rani ST, Aduri R, Patil BD. Prevalence of malocclusion among 6 to 10 year old Nalgonda School Children. *J Int Oral Health.* 2013; 5:49-54.
- 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; 111:525-32.
- Sambrook J, Russell DW. Quantitative PCR. *CSH Protoc.* 2006; 2006(1): pii: pdb.prot3842.

- Santiago HA, Zamarioli A, Sousa Neto MD, Volpon JB. Exposure to secondhand smoke impairs fracture healing in rats. *Clin Orthop Relat Res*. 2017; 475(3):894-902.
- Sawada M, Shimizu N. Stimulation of bone formation in the expanding mid-palatal suture by transforming growth factor-beta 1 in the rat. *Eur J Orthod*. 1996; 18:169-79.
- Shen Y, Liu HX, Ying XZ, Yang SZ, Nie PF, Cheng SW, Wang W, Cheng XJ, Peng L, Xu HZ. Dose-dependent effects of nicotine on proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells and the antagonistic action of vitamin C. *J Cell Biochem*. 2013; 114(8):1720-8.
- Sherwin MA, Gastwirth CM. Detrimental effects of cigarette smoking on lower extremity wound healing. *J Foot Surg*. 1990; 29(1):84 -7.
- Shintcovsk RL, Knop L, Tanaka OM, Maruo H. Nicotine effect on bone remodeling during orthodontic tooth movement: histological study in rats. *Dental Press J Orthod*. 2014; 19(2):96-107.
- Silverstein P. Smoking and wound healing. *Am J Med*. 1992; 93 (1A):22S-24S.
- Silva AP, Petri AD, Crippa GE, Stuardi AS, Stuardi AS, Rosa AL, et al. Effect of low level laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *Lasers Med Sci*. 2012; 27:777-83.
- Sodagar A, Donyavi Z, Arab S, Kharrazifard MJ. Effect of nicotine on orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011; 139(3):261-5.
- Stampfli MR, Anderson GP. How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9:377-84,.
- Tanaka H, Tanabe N, Kawato T, Nakai K, Kariya T, Matsumoto S, Zhao N, Motohashi M, Maeno M. Nicotine affects bone resorption and suppresses the expression of cathepsin K, MMP-9 and vacuolar-type H(+)-ATPase d2 and actin organization in osteoclasts. *PLoS One*. 2013;8(3):e59402.
- Wong PK, Christie JJ, Wark JD. The effects of smoking on bone health. *Clin Sci*. 2007; 113:233-41.
- Zandi M, Miresmaeili A, Heidari A. Short-term skeletal and dental changes following bone-borne versus tooth-borne surgically assisted rapid maxillary expansion: A randomized clinical trial study. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014; 22:1-6.
- Zhou Z, Li B, Dong Z, Liu F, Zhang Y, Yu Y, Shang F, Wu L, Wang X, Jin Y. Nicotine deteriorates the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells through  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor regulating Wnt pathway. *PLoS One*. 2013; 8(12):e83102.