

**Universidade do Brasil - UFRJ**

**Centro de Ciências da Saúde**

**Faculdade de Odontologia**

EXPRESSÃO DE OSTEOPONTINA, INTEGRINA  $\alpha V\beta 3$  E TRAP NO  
PROCESSO DE ABSORÇÃO RADICULAR INDUZIDO POR  
SUCESSIVOS CICLOS DE MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA

ANTONIO DE MORAES IZQUIERDO

- CD -

Tese submetida ao corpo docente da Faculdade de Odontologia da Universidade do Brasil - UFRJ, como parte dos requisitos, para a obtenção do Título de Doutor em Odontologia (Ortodontia).

Rio de Janeiro

- 2014 -

**EXPRESSÃO DE OSTEOPONTINA, INTEGRINA  $\alpha$ V $\beta$ 3 E TRAP NO  
PROCESSO DE ABSORÇÃO RADICULAR INDUZIDO POR SUCESSIVOS  
CICLOS DE MOVIMENTAÇÃO ORTODÔNTICA**

**Antonio de Moraes Izquierdo, C.D.**

**Orientadoras: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Matilde da Cunha Gonçalves Nojima**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thereza Christina Barja-Fidalgo**

**Tese submetida ao corpo docente da Faculdade de  
Odontologia da Universidade do Brasil - UFRJ, como parte dos  
requisitos, para obtenção do Título de Doutor em Odontologia  
(Ortodontia).**

**Comissão Examinadora:**

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Lincoln Issamu Nojima  
CD

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Eduardo Franzotti Sant'Anna  
CD

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Adriana de A. Cury-Saramago  
CD

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Matilde da Cunha Gonçalves Nojima  
CD

**Rio de Janeiro**

**2014**

**Ficha Catalográfica**

**IZQUIERDO, Antonio de Moraes**

**Expressão de Osteopontina, Integrina  $\alpha\beta 3$  e TRAP no Processo de Absorção Radicular Induzido por Sucessivos Ciclos de Movimentação Ortodôntica.** Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Odontologia, 2014.  
xviii, 73f.

**Tese: Doutorado em Odontologia (Ortodontia) – Universidade do Brasil - UFRJ, Faculdade de Odontologia, 2014.**

- |                                    |                              |
|------------------------------------|------------------------------|
| <b>1. Movimentação Ortodôntica</b> | <b>2. Absorção Radicular</b> |
| <b>3. Expressão de Proteínas</b>   | <b>4. Tese</b>               |

**I. Título**

**II. Tese (Doutorado – UFRJ/Faculdade de Odontologia)**

Às minhas filhas, **Izabela e Antonia**, geradoras de toda a minha energia, fontes inesgotáveis do meu amor.

À minha esposa, **Paula**, por todo o amor que nos une, por todo carinho e compreensão que tenho recebido, por fazer da minha vitória, uma conquista nossa.

À minha mãe, **Tânia**, minha fortaleza, minha fonte de inspiração, por ter sido mãe e pai, alicerce da família, por não ter deixado faltar nada na minha caminhada, amor, carinho, incentivo e confiança.

Ao meu pai, **Antonio**, meu exemplo e eterna saudade, a vida interrompeu bruscamente nosso convívio, havia muita coisa pela frente, segui a caminhada, não via mais tuas pegadas na areia, nunca me senti sozinho, sei que estava no seu colo.

Aos meus irmãos, **Carlos e Cristina**, meus melhores amigos, meus companheiros para a vida toda, pelos muitos e bons momentos já vividos juntos, pelos muitos que ainda virão.

À minha avó, **Dalila**, por todo o amor e carinho, por sua paciência e simplicidade, que me ensinam a ser uma pessoa melhor.

**“Ninguém será capaz de aprender algo,  
se estiver convencido de que já o sabe.”**

**Socrates**

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

A **Deus**, pelo dom da vida, pelas oportunidades recebidas, por me permitir aprender nos meus erros, por me ensinar a pedir perdão.

Aos meus sogros, **Carmen** e **Darcy**, pelo apoio e pelo carinho recebidos.

Ao pós-doutorando do Laboratório de Farmacologia Celular e Molecular da UERJ, **João Moraes**, pelos constantes auxílios na execução do trabalho, sobretudo na parte do RT-PCR.

À técnica do laboratório de Histologia da UERJ, **Ana Lúcia**, pela ajuda no preparo das lâminas.

À amiga, **Luciana Fernandes**, pelo auxílio na condução do trabalho.

**"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.**

**É melhor tentar, ainda em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.**

**Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.**

**Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver..."**

**(Martin Luther King)**

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **professora Dra. Matilde da Cunha Gonçalves Nojima**, todo o meu respeito e admiração, pelo carinho, pela sua simplicidade, educação e seriedade, pelo voto de confiança na continuidade do trabalho.

À minha co-orientadora **professora Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo**, toda a minha gratidão pelo braço estendido e seriedade na condução deste trabalho.

Ao **professor Dr. Jorge José de Carvalho**, do Departamento de Histologia IBRAG/UERJ, pelo auxílio na interpretação dos resultados.

À **Dra. Ana Maria Bolognese**, pela forma incansável com a qual conduz seus trabalhos, pelo exemplo a ser seguido, pela incomparável forma séria de transmitir o seu carinho, pela liberdade de trabalho oferecida.

Ao **Dr. Antônio Carlos de Oliveira Ruellas**, por sua simplicidade, palavras de incentivo e compreensão, pelas inúmeras oportunidades de trabalho proporcionadas, por acreditar no meu trabalho e compartilhar dos momentos de êxito, pela cumplicidade e amizade.

Ao **Dr. Eduardo Franzotti Sant'Anna**, pelo constante incentivo, pelas oportunidades oferecidas, por suas boas intenções, pela liberdade e confiança depositadas, pela amizade. É melhor tentar!

Ao **Dr. Lincoln Issamu Nojima**, por sua busca da perfeição, pela sua compreensão e amizade. Pelos bons momentos de trabalho compartilhados.

À **Dra. Margareth Maria Gomes de Souza**, pelo bom convívio, pelos ensinamentos transmitidos, pelo rigor necessário com o qual conduz suas atividades.

À **Dra. Mônica Tirre de Souza Araújo**, pelo bom convívio e amizade.

Aos professores das áreas de domínio conexo, **Lucianne Maia, Paulo Medeiros e Sandra Torres**, por contribuírem na minha formação.

Aos professores de Ortodontia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **Dr. Carlos Alberto Mundstock, Dr. Eduardo Silveira Ferreira, Dr. Enio José Barcellos Ferreira, Dr. José Renato Prietsch e Dr. Telmo Bandeira Berthold**, por serem os responsáveis pelos meus primeiros passos na Ortodontia, pelos bons momentos de convivência e pelas boas oportunidades de aprendizado nos dois anos e meio de Internato na Disciplina de Ortodontia da UFRGS.

Aos colegas de turma, **Sávio Prado e Ana de Lourdes**, por terem sido mais do que simples colegas, minha família.

Aos funcionários do Departamento de Ortodontia, **Mônica Mello, Robson França (in memoriam), Vanilda Saturnino e Waltencir Ferreira**, pela boa convivência e amizade.

Aos alunos, professores e técnicos do Laboratório de Farmacologia Celular e Molecular da UERJ, **Rafael Simões, Rafael Amêndola, Pedro, Mariana, Cristiane, Fernanda, Marta, Simone, Vani, Renata e Genílson**, pelos auxílios e bons momentos de convivência.

Aos Laboratórios de Farmacologia Celular e Molecular, de Histologia e de Neurobiologia da UERJ, pela disponibilização do espaço físico e equipamentos para a realização do trabalho.

A todos os meus amigos, familiares e colegas, pela confiança depositada, respeitando os meus erros, por emprestarem seu tempo e paciência para que minha formação profissional fosse a melhor possível.

À **CAPES**, pela bolsa de estudos concedida.

## RESUMO

**IZQUIERDO, Antonio de Moraes. Expressão de osteopontina, integrina  $\alpha\beta 3$  e TRAP no processo de absorção radicular induzido por sucessivos ciclos de movimentação ortodôntica.** Orientadoras Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Matilde da Cunha Gonçalves Nojima e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thereza Christina Barja-Fidalgo. Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Odontologia, 2014. Tese (Doutorado em Odontologia – Ortodontia). xviii, 73f.

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade clástica e a expressão de TRAP, osteopontina e integrina  $\alpha\beta 3$  na superfície radicular de dentes submetidos a sucessivos ciclos de movimentação ortodôntica. Utilizou-se 78 ratos Wistar machos, divididos em 3 grupos, com 3 subgrupos cada, de acordo com a data de sacrifício dos animais: O grupo Controle sem mola (Cs21, Cs42 e Cs63, n = 18) referiu-se àquele em que os animais não tiveram o dispositivo ortodôntico instalado. O grupo Controle com mola (Cc21, Cc42 e Cc63, n = 18) representou aquele em que os animais receberam o dispositivo ortodôntico instalado, no entanto, sem ativação. Os animais do Grupo Experimental (E21, E42 e E63, n = 42) tiveram a mola instalada e ativada. Uma mola de níquel-titânio aplicou força de 50cN sobre o primeiro molar superior esquerdo dos animais do grupo experimental, movendo-o em direção mesial, sendo reativada a cada 21 dias, totalizando 1, 2 e 3 ativações para os subgrupos E21, E42 e E63, respectivamente. A análise dos parâmetros estudados



foi realizada 21, 42 e 63 dias após a colocação do dispositivo. Parte das peças destinou-se à análise da expressão de F4/80, osteopontina (OPN) e osteoprotegerina (OPG) por RT-PCR e as demais foram submetidas a preparo histológico para evidenciação por imunofluorescência de OPN e integrina  $\beta 3$ , assim como para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), além de hematoxilina-eosina (HE). A análise histológica mostrou que houve aumento da atividade clástica, evidenciada pela presença de lacunas de absorção radicular na face mesial junto ao terço apical e de marcação para TRAP em todos os subgrupos do grupo experimental. A análise da expressão gênica de F4/80 mostrou aumento significativo nos animais dos subgrupos E21, E42 e E63. Nos cortes histológicos, detectou-se a expressão de OPN e integrina  $\beta 3$ , associadas à superfície radicular aos 21, 42 e 63 dias, sendo mais intensa aos 21 dias para ambas as proteínas. A análise da expressão gênica de OPN corroborou os resultados histológicos, mostrando aumento do RNA-m para OPN apenas no subgrupo E21. A expressão gênica de OPG sinalizou um aumento tardio, havendo diferença estatística apenas aos 42 e 63 dias. Os subgrupos controles com e sem mola não apresentaram áreas de absorção radicular, as marcações histológicas de TRAP, OPN e integrina  $\beta 3$  indicaram apenas atividade fisiológica junto ao tecido ósseo, com a expressão gênica de F4/80, OPN e OPG corroborando os achados histológicos. Diante dos resultados obtidos conclui-se que a movimentação dentária induzida por sucessivos ciclos de ativação da aparatologia ortodôntica manteve a resposta pró-inflamatória, com aumento da expressão de proteínas relacionadas à osteoclastogênese e reabsorção, acarretando no acúmulo de macrófagos e clastos nas áreas de compressão e aumento das áreas de absorção radicular.

## SUMMARY

**IZQUIERDO, Antonio de Moraes. Expressão de osteopontina, integrina  $\alpha\beta 3$  e TRAP no processo de absorção radicular induzido por sucessivos ciclos de movimentação ortodôntica.** Orientadoras Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Matilde da Cunha Gonçalves Nojima e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thereza Christina Barja-Fidalgo. Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Odontologia, 2014. Tese (Doutorado em Odontologia – Ortodontia). xviii, 73f.

The aim of this study was to evaluate clastic activity and TRAP, osteopontin and  $\alpha\beta 3$  integrin expression on the root surface of teeth submitted to repeated cycles of orthodontic activation. Seventy-eight male Wistar rats were divided into 3 groups, with 3 subgroups each, according to the date of sacrifice, as follows: control group without coil spring (Cs21, Cs42 e Cs63, n = 18) refers to the group of animals that did not have the orthodontic appliance installed; control group with coil spring (Cc21, Cc42 e Cc63, n = 18) refers to the group in which the appliance was installed but not activated; animals in the experimental group (E21, E42 e E63, n = 42) had the coil spring installed and activated. A NiTi spring applied a 50cN force on the animals' upper left first molar, causing its mesial displacement, and was reactivated every 21 days. There were 1, 2 and 3 activations in each of subgroups E21, E42 e E63, respectively. Parameter analyses were carried out 21, 42 and 63 days after the appliance was installed. Part of the specimen was destined to the analysis of F4/80,

osteopontin (OPN) and osteoprotegerin (OPG) expression using RT-PCR, and the remaining underwent histological preparation for OPN and  $\beta$ 3 integrin immunofluorescence evidencing, as well as TRAP and HE. Histological analysis showed an increase in clastic activity, due to the presence of resorption gaps on the mesial surface of the root, close to the apical third, and TRAP detection in all subgroups within the experimental group. F4/80 genetic expression analysis detected a significant increase only in Experimental group. On the histological cuts, OPN and  $\beta$ 3 integrin expression was present on the pressure side of root surface of specimens in experimental groups 21, 42 and 63 days, with greater intensity at 21 days for both proteins. OPN's genetic expression analysis supported the histological results, displaying an increase in m-RNA for OPN only in subgroup E21. OPG's genetic expression signaled a late increase, with statistical difference only in subgroups E42 and E63. Control subgroups with and without coil spring did not present areas of root resorption, histological markings of TRAP, OPN and  $\beta$ 3 integrin showed strictly physiological activity close to the bone; genic expression of F4/80, OPN and OPG supported histological findings. According to the results, it can be concluded that tooth movement induced by successive cycles of activation of orthodontic appliance maintained the pro-inflammatory response, with increased expression of proteins related to osteoclastogenesis and resorption, resulting in the accumulation of macrophages and osteoclasts in areas of compression and increasing areas of root resorption.

## RÉSUMÉ

**IZQUIERDO, Antonio de Moraes. Expressão de osteopontina, integrina  $\alpha\beta 3$  e TRAP no processo de absorção radicular induzido por sucessivos ciclos de movimentação ortodôntica.** Orientadoras Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Matilde da Cunha Gonçalves Nojima e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thereza Christina Barja-Fidalgo. Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Odontologia, 2014. Tese (Doutorado em Odontologia – Ortodontia). xviii, 73f.

Cette étude a pour but d'évaluer l'activité clastique et expression de TRAP, l'ostéopontine et l'intégrine  $\alpha\beta 3$  sur la surface radiculaire des dents soumis à des cycles successifs de mouvement orthodontique. Nous avons utilisé 78 rats mâles Wistar, qui ont été divisés en trois groupes, chacun avec 3 sous-groupes en fonction de leur sacrifice: groupe contrôle sans ressort (CS21, CS42 et CS63, n = 18) visées à celui dans lequel les animaux n'ont pas eu le dispositif orthodontique installé. Le groupe de contrôle avec le ressort (CC21, CC42 et Cc63, n = 18) visé à celle dans laquelle les animaux avaient le dispositif orthodontique installé, cependant, sans activation. Les animaux du groupe expérimental (E21, E42 et E63, n = 42) avaient le ressort installé et activé. Un ressort en nickel-titane a appliqué une force de 50cN sur la première molaire gauche supérieure des animaux, se déplaçant vers le mésial, et ça force a réactivé tous les 21 jours. Le total a été de 1, 2 et 3 pour l' activation E21, E42 et E63, respectivement des sous-groupes. L' analyse des paramètres a été réalisée pendant 21, 42 et 63 jours après la mise en place du dispositif. Une partie des morceaux a été conçue pour analyser l'expression de F4/80, OPN et OPG par

RT-PCR et les autres ont été soumis à une préparation histologique pour les analyses par immunofluorescence de OPN et l'intégrine  $\beta 3$ , et pour la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP), et l'hématoxyline-éosine (HE). L'analyse histologique a montré qu'il y a une élévation de l'activité clastique, comme en témoigne la présence de lacunes de l'absorption radiculaire dans la côte mésiale près le tiers apicale visualisée pour TRAP dans tous les sous-groupes du groupe expérimental. L'analyse de l'expression génique de F4/80 a montré une augmentation significative chez des rats expérimentaux. Dans des coupes histologiques nous avons détecté l'expression de l'OPN et  $\beta 3$  intégrine associée à la surface radiculaire du groupe expérimental à 21, 42 et 63 jours, ce qui était plus prononcé à 21 jours pour les deux protéines. L'analyse de l'expression génique de l'OPN a corroboré les résultats histologiques, nous avons vu une augmentation de mARN de l'OPN seulement dans le sous-groupe E21. L'expression génique de l'OPG a signalé une augmentation en retard, il n'y avait pas de différence statistique dans les sous-groupes E42 et E63. Les sous-groupes avec et sans ressorts ont montré aucune zone d'absorption radiculaire, des marqueurs histologiques TRAP, OPN et l'intégrine  $\beta 3$  ont indiqué que l'activité physiologique dans le tissu osseux, l'expression génique de F4/80, OPN et OPG a corroboré les résultats histologiques. Les résultats ont montré que le mouvement orthodontique qui a été provoquée par des cycles successifs d'activation de dispositif orthodontique maintenu la réponse pro-inflammatoire, avec une expression accrue de protéines liées à l'ostéoclastogenèse et de résorption, ce qui entraîne l'accumulation de macrophages et les ostéoclastes dans des zones de compression et des zones d'augmentation radiculaire.

## LISTA DE FIGURAS

<b>DELINEAMENTO DA PESQUISA</b>		Página
Quadro 1	Descrição cronológica do experimento.	18
Figura 1	Fotografias ilustrando a instalação do dispositivo ortodôntico no animal <b>A</b> Visualização do campo operatório com o animal sedado, imobilizado e com a boca aberta <b>B</b> Mola sendo fixada no primeiro molar superior esquerdo por baixo do ponto de contato com fio de amarrilho <b>C</b> Aplicação do adesivo autocondicionante utilizando um cone de papel nas canaletas laterais dos incisivos superiores <b>D</b> Tensionamento da mola e verificação da força aplicada com auxílio de um tensiômetro.	19
Figura 2	Fotografias ilustrando a instalação do dispositivo ortodôntico no animal <b>A</b> Fixação do fio de amarrilho nos incisivos superiores com resina composta nas canaletas <b>B</b> Fotopolimerização da resina composta <b>C</b> Corte dos incisivos inferiores com disco de carborundum <b>D</b> Dispositivo ortodôntico instalado.	20

**ARTIGO**

- Figure 1 Cronological description of the experiment. 49
- Figure 2 Decalcified section illustrating detail to be examined in the other figures. **M** Mesial; **D** Distal. HE 10X. Scale = 100µm. 49
- Figure 3 Decalcified sections illustrating morphological characteristics of the teeth resorption for control and experimental groups. **P** Pulp; **D** Dentin; **C** Cementum; **PL** Periodontal Ligament; **B** Bone. HE 20X. Subgroups: **A** E21. **B** Cc21. **C** Cs21. **D** E42. **E** Cc42. **F** Cs42. **G** E63. **H** Cc63. **I** Cs63. HE. Scale = 100µm. 50
- Figure 4 Decalcified sections illustrating morphological characteristics of the teeth resorption for control and experimental groups. **P** Pulp; **D** Dentin; **C** Cementum; **PL** Periodontal Ligament; **B** Bone. TRAP Fluorescence 20X. Subgroups: **A** E21. **B** Cc21. **C** Cs21. **D** E42. **E** Cc42. **F** Cs42. **G** E63. **H** Cc63. **I** Cs63. Scale = 100µm. 51
- Figure 5 Genic expression of F4/80 gene expression. 52
- Figure 6 Decalcified sections illustrating morphological characteristics of the teeth resorption for control and experimental groups. **P** Pulp; **D** Dentin; **C** Cementum; **PL** Periodontal Ligament; **B** Bone. OPN Fluorescence 20X. Subgroups: **A** E21. **B** Cc21. **C** Cs21. **D** E42. **E** Cc42. **F** Cs42. **G** E63. **H** Cc63. **I** Cs63. Scale = 100µm. 53
- Figure 7 Decalcified sections illustrating morphological characteristics of the teeth resorption for control and experimental groups. 54

**P** Pulp; **D** Dentin; **C** Cementum; **PL** Periodontal Ligament;  
**B** Bone.  $\alpha$ V $\beta$ 3 Fluorescence 20X. Subgroups: **A** E21.  
**B** Cc21. **C** Cs21. **D** E42. **E** Cc42. **F** Cs42. **G** E63. **H** Cc63. **I**  
Cs63. Scale = 100 $\mu$ m.

Figure 8 Genic expression of OPN gene expression. 55

Figure 9 Genic expression of OPG gene expression. 55



**LISTA DE ABREVIATURAS , SIGLAS E SÍMBOLOS**

LP	ligamento periodontal / periodontal ligament
IL-8	interleucina-8
LTB4	leucotrieno B4
IL-1	interleucina-1
IL-2	interleucina-2
IL-6	interleucina-6
TNF	fator de necrose tumoral
EGF	fator de crescimento epidérmico
PGDF	fator de crescimento derivado de plaquetas
Ca	cálcio
MCSF	fator de estimulação de colônia de macrófagos
RANK-L	ligante do receptor-ativador de NFkB
OPG	osteoprotegerina / osteoprotegerin
RANK	receptor-ativador de NFkB
TRAP	fosfatase ácida resistente a tartarato tartrate-resistant acid phosphatase
PNCs	proteínas não-colágenas
OPN	osteopontina / osteopontin
DSP	sialoproteína da dentina
DPP	fosfoproteína da dentina
DMPI	proteína de matriz da dentina I
EMP	proteínas da matriz do esmalte

IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
ml	mililitro
mm	milímetro
kg	kilo
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
PCR	reação em cadeia polimerase / polymerase chain reaction
°C	graus Celsius
min	minutos
s	segundos
PBS	Phosphate-buffered saline
NiTi	Níquel-Titânio / Nickel-Titanium
E	Experimental / Experimental
Cs	Controle sem mola / control without coil spring
Cc	Controle com mola / control with coil spring

**ÍNDICE**

	Página
1	INTRODUÇÃO..... 1
2	PROPOSIÇÃO..... 13
3	DELINEAMENTO DA PESQUISA..... 14
3.1	Modelo experimental..... 14
3.2	Manutenção dos animais..... 15
3.3	Caracterização da amostra..... 17
3.4	Preparo histotécnico das peças anatômicas..... 21
3.4.1	Técnica de imunofluorescência..... 23
3.4.2	Técnica para marcação de TRAP por fluorescência..... 24
3.4.3	Técnica de hematoxilina-eosina..... 24
3.4.4	Técnica da reação transcriptase reversa em cadeia da polimerase (rt-PCR)..... 25
3.5	Tratamento estatístico..... 27
4	DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA..... 28
4.1	ARTIGO Expression of osteopontin, $\alpha\beta 3$ integrin and TRAP in root resorption induced by experimental orthodontic force reactivation..... 28
5	DISCUSSÃO..... 56
6	CONCLUSÃO..... 63
7	RECOMENDAÇÕES..... 64
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 65
9	ANEXO..... 72

## 1 INTRODUÇÃO

A remodelação óssea caracteriza-se pela alternância de fenômenos fisiológicos de reabsorção e neoformação e desempenha um papel importante na manutenção estrutural e funcional do osso ao permitir que o mesmo se renove constantemente. Por outro lado, o dente que também é composto por tecidos mineralizados não apresenta o processo de remodelação e toda a atividade absorptiva que acomete os elementos permanentes é considerada patológica, uma vez que não há qualquer tipo de benefício com o evento. (Bhaskar, 1989)

A absorção radicular é a perda parcial de cemento e dentina radicular do dente (Pizzo, Licata *et al.*, 2007) constituindo-se uma das sequelas mais frequentes do tratamento ortodôntico. (Brezniak e Wasserstein, 2002b; a) Deve ser controlada, entendidas as causas para que sejam minimizados os efeitos. Sua ocorrência traduz-se em perda de inserção do dente, ainda que na maioria das vezes isso não comprometa a permanência do mesmo. (Consolaro, 2005)

Segundo Andreasen (1985), a absorção radicular externa de superfície é aquela, em geral, associada ao movimento ortodôntico. Caracteriza-se pelo aspecto autolimitante, envolvendo inicialmente pequenas áreas na superfície radicular externa, seguida por reparo através de células originadas das partes adjacentes intactas do ligamento periodontal (LP).

Na movimentação ortodôntica, a frequência de absorção dentária é elevada, embora passageira ou temporária. Mesmo assim, a ocorrência não deve ser referida como normal e sim como frequente, aceitável clinicamente. Segundo Reitan (1974), ocorre diminuição do comprimento dentário e do suporte periodontal do dente, sendo a região apical a mais acometida. (Reitan, 1974)

A etiopatogenia das absorções radiculares é variada e envolve a combinação de aspectos genéticos, ambientais, bioquímicos, morfológicos, sistêmicos e mecânicos. (Rygh, 1977; Brezniak e Wasserstein, 1993b; a; Acar, Canyurek *et al.*, 1999; Al-Qawasmi, Hartsfield *et al.*, 2003; Consolaro, 2005) Estudos associando predisposição genética à absorção dentária são ainda inconclusivos, com relatos que sugerem desde alguma correlação direta entre componente genético e absorção radicular (Al-Qawasmi, Hartsfield *et al.*, 2003; Al-Qawasmi, Hartsfield *et al.*, 2006) até estudo no qual não foi encontrada qualquer correlação entre ambos. (Newman, 1975)

Considerando aspectos anatômicos locais, relaciona-se a ocorrência de absorções radiculares com morfologia radicular (forma, comprimento e angulação entre coroa e raiz) e morfologia óssea (altura, espessura e forma de crista alveolar). Formas radiculares afiladas e dilaceradas, bem como raízes curtas e anguladas em relação à coroa são mais predispostas à absorção, assim como cristas alveolares com alturas reduzidas, espessas e em forma quadrangular, que propiciam maior concentração das forças ortodônticas por sofrerem menor deflexão óssea. (Brezniak e Wasserstein, 1993b; a; Sameshima e Sinclair, 2001b; a; Consolaro, 2005)

Abordando fatores sistêmicos, alguns trabalhos consideram que endocrinopatias como hipotireoidismo, hiperpituitarismo e hiperparatireoidismo

teriam significado etiológico preponderante nas absorções radiculares. (Carpol, 1961; Counts e Widlak, 1993) No entanto, outros autores mostram que alterações hormonais podem influenciar, mas não causar absorção radicular. (Newman, 1975; Furquim, 2002)

Histórico de traumatismo, tratamento endodôntico e absorção prévia aumentam o risco de absorções radiculares durante a movimentação ortodôntica. (Consolaro, 2005) Além disso, tratamentos prolongados, movimentações extensas, emprego de força elevada e movimentos de vai-e-vém são fatores que contribuem para a ocorrência de absorção radicular. (Sameshima e Sinclair, 2001b; a; Consolaro, 2005)

O estímulo mecânico do aparelho ortodôntico, ou seja, o deslocamento do dente no espaço do LP, promove diretamente a compressão ligamentar no lado para o qual o dente se desloca e tensão no lado oposto. A deformação do tecido adjacente promove a quebra do equilíbrio local e induz a resposta inflamatória reparadora. O estresse gerado modifica a permeabilidade da membrana celular e resulta na ativação de vias metabólicas intracelulares, com liberação de substâncias que atuam como mediadores capazes de induzir fenômenos de natureza celular, tecidual e vascular. Além disso, a injúria tecidual causa a degranulação de mastócitos do LP, levando à liberação de histamina e promovendo a síntese de neuropeptídeos. Os mediadores inflamatórios atuam sobre a microcirculação, causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, que resulta no extravasamento de plasma para o interstício e formação de edema. (Consolaro, 2005)

O processo inflamatório progride com a migração de leucócitos para o foco da injúria, um efeito mediado pela ação de quimiocinas produzidas localmente e

que formam um gradiente de concentração a partir da área afetada. Através da liberação de quimiocinas e outros mediadores como a interleucina-8 (IL-8) e o leucotrieno B4 (LTB4), os neutrófilos são inicialmente recrutados para o local, sendo seguidos pelos macrófagos, que predominam entre 24 e 72 horas, exercendo várias e fundamentais funções, tanto na resposta inflamatória como na resolução da inflamação e cicatrização. Como poderosos fagócitos, essas células fagocitam pequenas e grandes partículas, reabsorvem restos celulares e teciduais durante a reorganização e reparação do ligamento periodontal. São grandes produtores de mediadores para o meio extracelular.

Os mediadores locais produzidos e liberados pelas células para a intercomunicação são peptídeos, pequenas proteínas denominadas genericamente de citocinas e recebem individualmente vários nomes e classificações. Quando algumas dessas citocinas induzem fenômenos produtivos de síntese, proliferação e relacionados à diferenciação celular, também recebem a designação geral de fatores de crescimento. As principais citocinas presentes são: interleucina-1  $\alpha$  e  $\beta$  (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF). Já os fatores de crescimento são: fator de crescimento epidérmico (EGF), fator ativador de fibroblasto, fator de crescimento derivado das plaquetas (PGDF).

Além das citocinas e fatores de crescimento, as células também se intercomunicam através de outros mediadores locais, os ácidos graxos produzidos a partir de fosfolipídios da membrana das células estressadas e denominados genericamente de produtos derivados do ácido araquidônico, em especial, as prostaglandinas e os leucotrienos.

No estresse celular, aumenta a entrada de cálcio (Ca) para o interior da célula. O maior afluxo de Ca estimula várias enzimas, como a fosfolipase A2 ou C, que mobilizam os fosfolípidios da membrana celular, quebram suas moléculas e, os fragmentos obtidos, caracterizam estruturalmente o ácido araquidônico. No citoplasma, essas moléculas sofrem ação da cicloxigenase gerando prostaglandinas, ou da lipoxigenase, gerando leucotrienos. A essa forma sequencial e dinâmica, dá-se o nome de ciclo metabólico do ácido araquidônico. Outros mediadores também são liberados, como óxido nítrico e esteróides. (Consolaro, 2005)

A reabsorção dos tecidos mineralizados efetua-se pela ação dos clastos. O paratormônio e a prostaglandina E2 promovem a contração do citoesqueleto do osteoblasto, abrindo espaço para a enzima colagenase degradar o osteóide. O deslocamento dos osteoblastos da superfície óssea e a digestão do osteóide expõem os cristais de hidroxiapatita que parecem exercer efeito quimiotático sobre os clastos inativos.

Essa mobilização celular para a área também tem mediação dos fatores locais, além de sistêmicos (paratormônio, vitamina D3, calcitonina e estrógenos), que interagem nos receptores específicos nas membranas de osteoblastos e macrófagos, ou seja, indiretamente nos clastos. (Rodan e Martin, 1981) A fonte de mediadores está representada pelo exsudato inflamatório e pelas células leucocitárias e locais. Também há mediadores locais de origem plasmática, como fibrina, cinina e plasmina.

Assim ativados, os osteoblastos liberam um fator solúvel para o qual os clastos apresentam receptores específicos. Os clastos não apresentam receptores de superfície para os derivados do ácido araquidônico, paratormônio



ou para as citocinas IL-1 e TNF, mas apresentam para calcitonina e estrógenos (inibidores da atividade celular), evidenciando uma ação direta desses hormônios.

Os osteoclastos são ativados sob a influência de fatores de diferenciação e maturação, incluindo o fator de estimulação de colônia de macrófagos (MCSF) (Fujikawa, Sabokbar *et al.*, 2001) e o ligante do receptor-ativador de NFκB (RANK-L) (Feige, 2001) liberados respectivamente por macrófagos e osteoblastos. (Holliday, Welgus *et al.*, 1997; Rody, King *et al.*, 2001)

A osteoprotegerina (OPG) e o RANK-L são reguladores chaves da remodelação óssea. O RANK-L é essencial na formação, fusão, ativação e sobrevivência do clasto, enquanto a OPG antagoniza a sua ação, impedindo que ele se ligue ao receptor-ativador de NFκB (RANK) e faça com que os macrófagos assumam o fenótipo de clastos.

A instalação da unidade osteorremodeladora sobre a superfície óssea desnuda de osteóide caracteriza-se também pelo estabelecimento de um microambiente a partir da firme adesão dos clastos. A adesão à superfície óssea se dá através da formação da zona de selamento, os clastos polarizam para criar uma borda ativa ou em escova de forma enrugada, com prolongamentos citoplasmáticos especializados voltados para a lacuna de absorção. (Roodman, 1999; Boyle, Simonet *et al.*, 2003)

O vedamento da interface do clasto com a superfície óssea é propiciado por um anel de proteínas contrácteis que promove junções bem definidas. A integrina αvβ3 da membrana celular clástica interage com proteínas da matriz óssea.

A formação da zona de selamento é essencial para a polarização dos clastos, pois constitui uma barreira de difusão, isola a área da borda em escova

do meio e permite a secreção direcionada de ácidos, como a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), e enzimas lisossomais, como a catepsina K. (Denhardt e Guo, 1993) Os clastos liberam também nesse local a colagenase, responsável pela digestão da matriz óssea.

A expressão conjunta de TRAP e catepsina K é bem específica, sendo a TRAP considerada o principal marcador de atividade clástica. (Minkin, 1982; Cole e Walters, 1987; Brudvik, 1992; Hayman e Cox, 2003; Filgueira, 2004) No entanto, a TRAP pode ser também expressa por outras células como macrófagos e células dendríticas. (Tsuboi, Matsui *et al.*, 2003; Walsh, Cahill *et al.*, 2003)

Periodicamente, o clasto abre fenestrações nesse microambiente, derramando no meio extracelular seu conteúdo altamente concentrado e saturado de elementos removidos do tecido ósseo. Parte da matriz pode ser fagocitada e parcialmente digerida em vacúolos citoplasmáticos que acabarão por transportar seu conteúdo para fora do ambiente, abrindo-se na membrana celular clástica voltada para a porção externa à lacuna de Howship. Esse processo é chamado de transcitose.

As células responsáveis pela absorção radicular são denominadas odontoclastos e são similares aos osteoclastos nos seus aspectos estruturais e funcionais. (Morita, Yamashiya *et al.*, 1970; Brudvik e Rygh, 1993; Tsuji, Yamaza *et al.*, 2001) As diferenças estrutural, organizacional e funcional entre odontoclastos e osteoclastos são insignificantes, ainda que detectáveis. (Morita, Yamashiya *et al.*, 1970; Hammarstrom e Lindskog, 1985; Brudvik e Rygh, 1993; Tsuji, Yamaza *et al.*, 2001; Brezniak e Wasserstein, 2002b; a; Consolaro, 2005) Para Sasaki, em 2003, não há diferença entre essas células depois de estudá-las

comparativamente na microscopia eletrônica e imunoenzimaticamente. Essas células podem ser referidas simplesmente como clastos.

Na superfície do cimento, situam-se ainda os cementoblastos, que não possuem receptores aos mediadores químicos da absorção, em especial ao paratormônio, conferindo proteção à superfície radicular da ação dos clastos. (Lindskog, Blomlof *et al.*, 1987; Consolaro, 2005) Isso explica a viabilidade da movimentação ortodôntica.

A absorção radicular tem como pressuposto a perda de seu recobrimento por parte dos cementoblastos. Na área de pressão, a força aplicada sobre o dente pode comprimir os vasos do LP de tal forma que leva ao desenvolvimento de uma zona de necrose asséptica (zona de hialinização). Os cementoblastos são afetados e a superfície radicular torna-se desprotegida e susceptível à absorção. (Reitan, 1967; Rygh, 1977)

A perda de material radicular ocorre adjacente e subjacente à área hialinizada como efeito colateral da atividade celular associada à remoção do tecido hialinizado. (Brudvik e Rygh, 1993) A necrose de cementoblastos em áreas de pequenas dimensões pode ser compensada pela proliferação e migração dos cementoblastos e pré-cementoblastos vizinhos, restabelecendo-se a normalidade e a proteção da superfície dentária radicular.

As primeiras células envolvidas na remoção do tecido necrótico na periferia da zona de hialinização são negativas para TRAP, não apresentam borda em escova e assemelham-se a macrófagos, provavelmente ativadas por sinais provenientes do tecido com necrose estéril. Posteriormente, observa-se o aparecimento de células gigantes multinucleadas no centro da área hialinizada e células multinucleadas com borda em escova positivas para TRAP nas lacunas de

absorção, os clastos propriamente ditos. (Brudvik e Rygh, 1993; 1994; Brezniak e Wasserstein, 2002a; b)

O reconhecimento dos componentes da matriz extracelular dos tecidos mineralizados pelos clastos é um passo importante na iniciação funcional destas células. (Denhardt e Guo, 1993; Dolce, Vakani *et al.*, 2003; Blair e Zaidi, 2006; Nakamura, Duong Le *et al.*, 2007) As matrizes de osso e cimento são compostos biológicos que consistem de água, minerais, macromoléculas colágenas e não-colágenas, estas últimas conhecidas como proteínas não-colágenas (PNCs).

Nos tecidos mineralizados o colágeno interage com diversas PNCs e compõem um arcabouço para a acomodação dos cristais minerais. (Christoffersen e Landis, 1991) No osso e cimento, o colágeno é o principal componente da matriz extracelular, compreendendo 80 a 90% da matriz orgânica. O predominante é o tipo I, no entanto os tipos III, V, VI e XII também estão presentes. (Bosshardt, 2005)

Mais de 20 PNCs foram identificadas no osso, cimento e dentina. As funções destas PNCs compreendem a iniciação, deposição e regulação da mineralização e remodelação da matriz. (Robey, 1996; Butler, 1998; Fisher, Torchia *et al.*, 2001; Sodek, Zhu *et al.*, 2002)

Atualmente sabe-se que certas PNCs que antes eram consideradas específicas de alguns tecidos também estão presentes em outros tipos tissulares. Exemplos incluem osteopontina (OPN), sialoproteína da dentina (DSP), fosfoproteína da dentina (DPP), proteína de matriz da dentina I (DMPI) e algumas proteínas da matriz do esmalte (EMP). Desta forma, pode-se considerar que osso, cimento e dentina possuem um conjunto de PNCs em comum e que a

singularidade de cada tecido consiste na combinação destas PNCs. (Butler, Brunn *et al.*, 2003; Bosshardt, 2005)

A OPN e a DSP são as duas maiores PNCs do osso e cemento. (Bronckers, Farach-Carson *et al.*, 1994; Macneil, Berry *et al.*, 1996; D'errico, Macneil *et al.*, 1997; Bosshardt, Zalzal *et al.*, 1998; Nanci, 1999) A OPN está ligada à promoção e regulação da adesão, além da distribuição dos osteoclastos pela superfície óssea durante sua reabsorção. Sabe-se que é produzida por osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, macrófagos e está presente nos processos de absorção e mineralização da matriz óssea. (Terai, Takano-Yamamoto *et al.*, 1999; Chung, Soma *et al.*, 2008)

Em trabalho recente, mostrou-se que camundongos deficientes em OPN quando submetidos ao movimento dentário induzido sofreram diminuição na formação de odontoclastos, com conseqüente redução na absorção radicular, quando comparados ao tipo selvagem. (Chung, Soma *et al.*, 2008) Outro trabalho constatou um aumento na expressão de OPN em osteócitos no lado de pressão de 3,3% para 87,5%, após 48 horas do início da aplicação de força ortodôntica. (Terai, Takano-Yamamoto *et al.*, 1999)

A adesão do clasto à superfície mineralizada se dá através das integrinas, proteínas que atravessam as duas camadas da membrana celular e funcionam como um canal de integração dos meios interno e externo. As integrinas compõem a principal família de receptores de superfície celular que medeiam a adesão à matriz extracelular. As integrinas medeiam vários tipos de interações célula-célula e célula-matriz, sendo compostas de subunidades transmembranosas alpha ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ).

Atualmente, existem 16 subunidades  $\alpha$  e oito  $\beta$  conhecidas, que se dimerizam de maneira heterogênea, para produzir 20 receptores diferentes. As integrinas reconhecem uma ampla gama de ligantes celulares e de componentes da matriz extracelular (colágeno, fibronectina, vitronectina). Estes ligantes formam ligações cruzadas ou se agrupam às integrinas por união às moléculas de integrinas adjacentes na superfície celular.

A sinalização mediada pelas integrinas regula uma variedade de funções celulares incluindo desenvolvimento embrionário, hemostasia, ativação de leucócitos, reabsorção óssea, resposta celular ao estresse mecânico, crescimento tumoral e metástases. (Miyachi, Alvarez *et al.*, 1991; Duong, Lakkakorpi *et al.*, 2000; Schwartz, 2001; Boyle, Simonet *et al.*, 2003; Giancotti, 2003; Kamada, 2003; Katsumi, Orr *et al.*, 2004; Qin, Vinogradova *et al.*, 2004; Luckashenak e Clements, 2007)

A integrina  $\alpha\beta3$  é o principal receptor de adesão presente na membrana celular clástica e interage com proteínas da matriz mineralizada, especialmente a OPN e a DSP, através do reconhecimento da sequência tripeptídica: Arginina-Glicina-Ácido aspártico, presente nestas proteínas. (Flores, Norgard *et al.*, 1992; Fisher, Caulfield *et al.*, 1993; Yamamoto, Fisher *et al.*, 1998; Talic, Evans *et al.*, 2006)

A união firme e estável do clasto à superfície mineralizada é denominada de anel ou zona de selamento. Substâncias capazes de levar à quebra desta união poderiam ser utilizadas terapeuticamente no controle e tratamento das reabsorções ósseas e dentárias. (Consolaro, 2005) Contudo, na busca desses alvos terapêuticos, torna-se necessário um maior conhecimento sobre a

distribuição temporal e os aspectos funcionais das células e mediadores que modulam os processos de selamento e da absorção dentária.

As expressões do papel da integrina  $\alpha\beta3$  e da glicoproteína osteopontina na reabsorção óssea já foram descritas. (Flores, Norgard *et al.*, 1992; Fisher, Caulfield *et al.*, 1993; Yamamoto, Fisher *et al.*, 1998; Talic, Evans *et al.*, 2006) No entanto, faltam evidências sobre suas participações no processo de absorção radicular decorrente da movimentação ortodôntica. Uma vez caracterizado o papel das integrinas neste processo, estes receptores e seus ligantes poderão tornar-se alvos farmacológicos importantes para o tratamento preventivo de absorções radiculares, além de promover, sob o aspecto clínico, o aumento da ancoragem ortodôntica.

## 2 PROPOSIÇÃO

Avaliar a atividade clástica e a expressão de TRAP, osteopontina (OPN) e integrina  $\alpha\beta 3$  na superfície radicular de primeiros molares superiores de ratos machos da linhagem *Wistar* após a aplicação de repetidos ciclos de força ortodôntica:

2.1 localizando e caracterizando histologicamente as lacunas de absorção em relação à TRAP, OPN e integrina  $\alpha\beta 3$ , e

2.2 analisando a variação na expressão das proteínas F4/80, OPN e osteoprotegerina (OPG) ao longo do tempo experimental.



### 3 DELINEAMENTO DA PESQUISA

#### 3.1 MODELO EXPERIMENTAL

Neste estudo foi empregado método experimental *in vivo*. Foram utilizados 78 ratos de laboratório (*Rattus norvegicus*), roedor da família *Muridae* e da variedade genética *Wistar*, com idade aproximada de 90 dias e massa corporal média de 300 gramas. Todos os animais incluídos na amostra eram machos. A escolha por ratos machos visou eliminar a variação hormonal associada ao estro nas fêmeas. (Dolce, Vakani *et al.*, 2003; Izquierdo, Mishima *et al.*, 2012)

O protocolo de experimentação animal foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), por estar de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os ratos da linhagem *Wistar* apresentam ciclo vital aproximado de 3 anos. Determinadas características biológicas inerentes a esses animais foram consideradas na realização da presente pesquisa, conforme será apresentado no relato da metodologia empregada: tempo de gestação de 21 a 23 dias; massa corporal ao nascimento de 5 a 6 g; massa corporal na idade adulta de 250 a 300 g

para os animais fêmeas e de 450 a 520 g para os machos; idade de desmame aproximada aos 21 dias (com 40 a 50 g de massa corporal); início da vida reprodutiva no intervalo de 65 a 110 dias de vida e senescência sexual entre 450 e 500 dias de idade, com período reprodutivo de 9 a 12 meses, alcance da puberdade entre 50 e 60 dias, com a abertura vaginal constatada dos 35 aos 90 dias. (Harkness e Wagner, 1993; Mezdari, Tomáz *et al.*, 2004; Izquierdo, Mishima *et al.*, 2012)

### **3.2 MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS**

O experimento foi desenvolvido no biotério do Departamento de Bioquímica do IBRAG/UERJ. As instalações utilizadas para a manutenção dos animais proveram seu bem-estar físico e psicossocial. Os mesmos foram mantidos em gaiolas específicas para a criação de ratos. (Baker, Lindsey *et al.*, 1979) A gaiola-viveiro era constituída por caixa de polipropileno semi-fosco, com dimensões de 42x34x16 cm (BrasHolanda) e tampa gradeada de aço inoxidável (Tegarame), adequada às dimensões da caixa e com locais específicos para a colocação de alimento e água. As gaiolas eram sólidas e seguras, de fácil higienização, com espaço físico suficiente que permitiu a movimentação apropriada dos animais (250 cm<sup>2</sup> de espaço físico por animal). A temperatura ambiente foi mantida em 22° C (variando de 18 a 26° C); a umidade relativa do ar na faixa de 40 a 70 %; a intensidade luminosa de 32 a 40 lumes / m<sup>2</sup>, com fotoperíodo controlado de 12 horas claro e 12 horas escuro, permitindo um ciclo metabólico correto; bem como média de 10 trocas completas do ar ambiente (fresco e filtrado) por hora. (Harkness e Wagner, 1993; Tanaka, 1998; Mezdari, Tomáz *et al.*, 2004) Não

houve necessidade de período de aclimatação, uma vez que o nascimento e o experimento ocorreram no mesmo ambiente.

As instalações e equipamentos utilizados eram limpos e desinfetados, em média, a cada 72 horas, efetuando-se a troca de maravalha antiga, restos de ração e água, por novas porções. O desinfetante selecionado, por sua praticidade e segurança, foi a solução de 30 ml de hipoclorito de sódio 5% diluído, imediatamente antes do uso, em 1 l de água, tendo sido aplicado apenas em utensílios livres de matéria orgânica. (Harkness e Wagner, 1993) A cama, material utilizado no forro da gaiola, constituiu-se de raspas de madeira (*maravalha pinus*), material totalmente inofensivo, atóxico, absorvente, isolante térmico, sem pó e não comestível pelos animais. Sua troca foi efetuada 3 vezes por semana, evitando-se a formação excessiva de amônia, em decorrência da decomposição bacteriana de fezes e urina. (Harkness e Wagner, 1993; Mezadri, Tomáz *et al.*, 2004)

Os bebedouros e comedouros foram instalados de forma a prevenirem, ao máximo, a contaminação, adequando-se à idade do animal alojado, sendo acessíveis e funcionais. Água potável foi fornecida *ad libitum*. Os animais receberam dieta saudável, sob condições higiênicas, corretamente balanceada e em quantidade adequada. A alimentação foi à base de ração apropriada (Nuvilab CR1 – Nuvital Nutrientes), mantendo-se dieta constante conforme as necessidades de energia, lipídios, carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais (Tanaka, 1998). O consumo médio para essa espécie é de 5 g de ração e 10 ml de água por dia para cada 100 g de massa corporal. (Harkness e Wagner, 1993; Mezadri, Tomáz *et al.*, 2004)

Cada gaiola foi devidamente identificada, não sendo misturados animais dos grupos controle e experimental em um mesmo espaço. A identificação dos

animais, por sua vez, foi realizada por meio de numeração com substância não tóxica (violeta genciana) aplicada, diretamente, no pêlo de cada um dos ratos.

### **3.3 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

Os 78 animais machos foram divididos em três grupos: grupo Controle sem mola com 18 animais (grupo Cs), grupo Controle com mola com 18 animais (grupo Cc) e grupo Experimental com 42 animais (grupo E). Em cada grupo, os animais foram distribuídos em 3 subgrupos, os quais eram compostos por 6 animais cada nos grupos Cs e Cc e, por 14 animais cada, no grupo Experimental. Cada subgrupo diferiu entre si pelos intervalos de tempo transcorridos desde a instalação da mola/corte dos incisivos até o momento dos sacrifícios, estabelecidos em 21, 42 e 63 dias.

O grupo Controle sem mola (Cs21, Cs42 e Cs63) referiu-se àquele em que os animais receberam a administração anestésico/relaxante muscular e tiveram os incisivos inferiores cortados, no entanto, sem a instalação do dispositivo ortodôntico (Quadro 1, página 18).

O grupo Controle com mola (Cc21, Cc42 e Cc63) referiu-se àquele em que os animais receberam a administração anestésico/relaxante muscular, tiveram os incisivos inferiores cortados e a instalação do dispositivo ortodôntico, no entanto, sem ativação (Quadro 1, página 18).

Os animais do Grupo Experimental (E21, E42 e E63) receberam a administração do anestésico/relaxante muscular, tiveram os incisivos inferiores cortados, tendo recebido a instalação e ativação da mola no primeiro molar superior esquerdo e incisivos superiores (Quadro 1, página 18).

Grupos \ Dias	Dias			
	0	21	42	63
Cs (18)	$\Theta(18)$	$\Theta(12)$	$\Theta(6)$	
		$\dagger(6)$	$\dagger(6)$	$\dagger(6)$
Cc (18)	$\Theta(18)$	$\Theta(12)$	$\Theta(6)$	
	$\emptyset(18)$	$\dagger(6)$	$\dagger(6)$	$\dagger(6)$
E (42)	$\Theta(42)$	$\Theta(28)$	$\Theta(14)$	
	$\emptyset(42)$			
	$\Phi(42)$	$\Phi(28)$	$\Phi(14)$	
		$\dagger(14)$	$\dagger(14)$	$\dagger(14)$

**Quadro 1** Descrição cronológica do experimento.

$\Theta$  = anestesia/corte dos dentes     $\emptyset$  = instalação da mola

$\Phi$  = ativação da mola     $\dagger$  = sacrifício

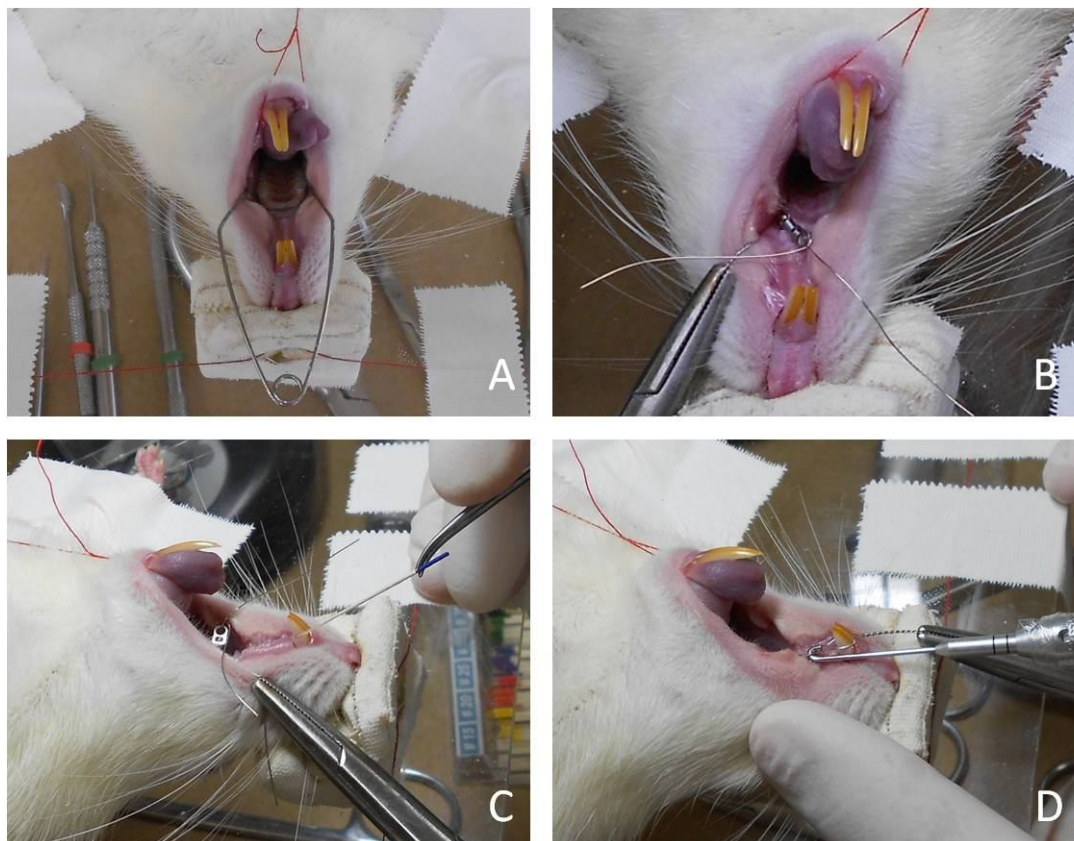
( ) = número de animais participantes

Na administração do anestésico/relaxante muscular, foram utilizadas agulhas de comprimento e calibre pequenos, 6 e 0,25 mm respectivamente, em seringas de 1 ml (Ultrafine), para que não ocorresse injeção intravenosa acidental. Outra medida preventiva foi a leve aspiração com a seringa antes da injeção, como modo de certificação do posicionamento correto no tecido muscular. (Griffith e Farris, 1942)

A instalação dos dispositivos ortodônticos foi realizada no dia 0 (zero) sob sedação com injeção intraperitoneal de 1,33 ml/kg de Cloridrato de Quetamina (Vetanarcol - König, Avellaneda, Argentina), associado a 0,67 ml/kg de Cloridrato de Xilazina (Kensol - König, Avellaneda, Argentina).

O modelo de movimento ortodôntico experimental foi executado amarrando-se uma mola de níquel-titânio fechada de 7,0 mm de comprimento (Morelli® ref. 35.20.064) no primeiro molar esquerdo e nos incisivos superiores. Adaptou-se a

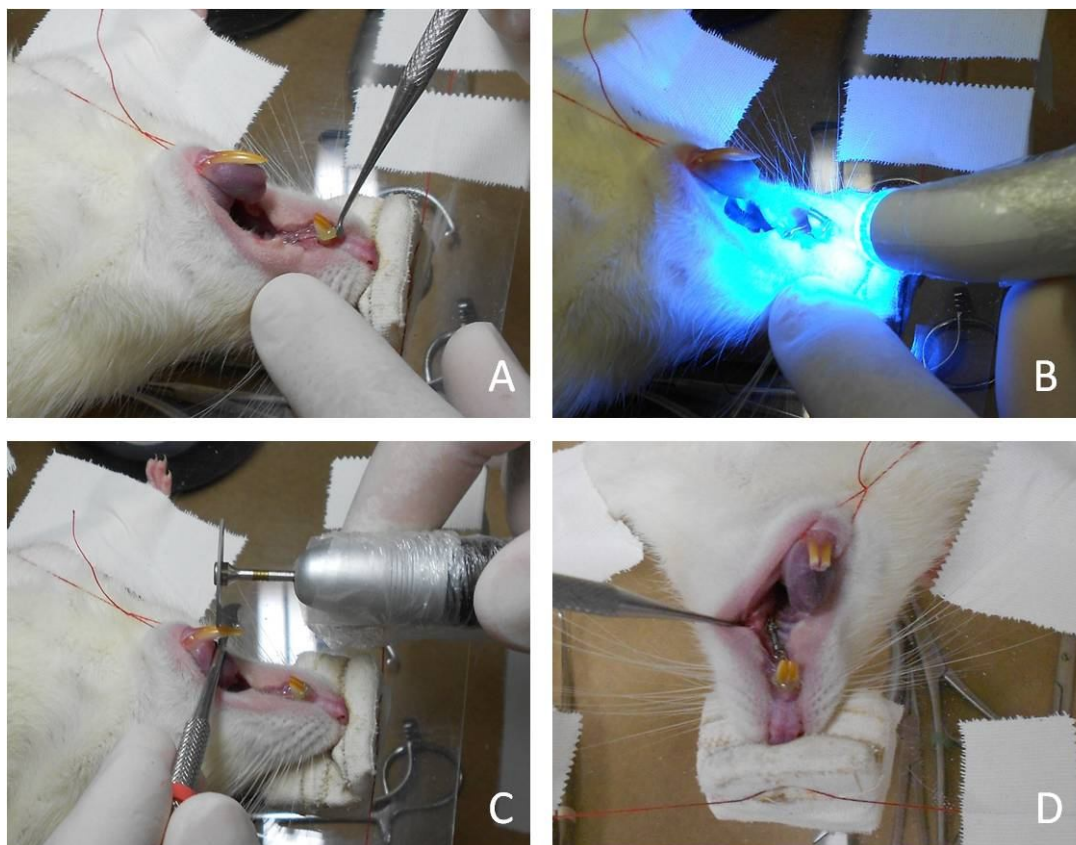
mola no primeiro molar por um segmento de fio de amarrilho de 8 milésimos de polegada (0,008"), contornando-se o dente abaixo do ponto de contato e torcendo o fio em seguida (Figura 1 A e B).



**Figura 1** Fotografias ilustrando a instalação do dispositivo ortodôntico no animal  
**A** Visualização do campo operatório com o animal sedado, imobilizado e com a boca aberta **B** Mola sendo fixada no primeiro molar superior esquerdo abaixo do ponto de contato com fio de amarrilho **C** Aplicação do adesivo autocondicionante utilizando um cone de papel nas canaletas laterais dos incisivos superiores **D** Tensionamento da mola e verificação da força aplicada com auxílio de um tensiômetro.

Para fixar e evitar o deslocamento da mola foi construída uma canaleta horizontal nos incisivos, na região mais cervical possível, com o auxílio de disco de carborundum em baixa rotação, com refrigeração a ar. A superfície dos incisivos foi preparada com adesivo autocondicionante hidrofílico (Transbond Plus Self Etching Primer®, 3M) e polimerizada por 20 segundos. A mola foi distendida de forma a aplicar uma força de 50 cN, aferida com tensiômetro, sendo fixada,

anteriormente, com fio de amarrilho na canaleta ao redor dos incisivos superiores (Figura 1 C e D, página 19). Após amarrar a mola, aplicou-se resina composta (Transbond XT Light Cure Resin®, 3M) contornando o fio sobre a canaleta nos incisivos e nova polimerização foi realizada por 60 segundos (Figura 2 A e B). Os incisivos inferiores foram desgastados com disco de carborundum para preservar a integridade do dispositivo (Figura 2 C e D). A fim de permitir a alimentação adequada dos animais e evitar o deslocamento do dispositivo, a ração peletizada foi substituída por moída.



**Figura 2** Fotografias ilustrando a instalação do dispositivo ortodôntico no animal  
**A** Fixação do fio de amarrilho nos incisivos superiores com resina composta nas canaletas **B** Fotopolimerização da resina composta **C** Corte dos incisivos inferiores com disco de carborundum **D** Dispositivo ortodôntico instalado.

Nos animais com data de sacrifício aos 42 e 63 dias, nova tensão foi dada na mola no 21º dia. Nos animais com data de sacrifício aos 63 dias, nova tensão

foi dada na mola no 42º dia de experimento. Nos animais dos grupos Cs e Cc, todo o ritual foi seguido exatamente como no grupo E, exceto a instalação e ativação da mola no grupo CS e a ativação da mola no grupo Cc.

A eutanásia foi realizada por meio de hipoxemia com gás carbônico. A seguir, iniciou-se o preparo das peças anatômicas com a dissecação da maxila, cujas metades foram separadas, seguindo-se a fixação para processamento histológico ou o congelamento e a trituração para extração de RNA.

### **3.4 PREPARO HISTOTÉCNICO DAS PEÇAS ANATÔMICAS**

Após o período de fixação em solução de paraformaldeído 10% com tampão cacodilato, pH 7.2, por um período de 24 horas, seguiu-se o preparo dos espécimes pelo método de descalcificação, a partir da imersão em solução à base de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) a 10%, pelo período de 6 a 8 semanas. Para confirmar-se a remoção completa dos minerais, foi utilizado o teste de punção do tecido duro com agulha.

Uma vez obtida a descalcificação, o material foi inserido em cassetes plásticos individuais, lavado por 15 minutos em água corrente com o objetivo de retirar-se o excesso de EDTA e, então, de modo gradativo, desidratado em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes. Os espécimes foram imersos, permanecendo 30 minutos, sequencialmente, em álcool 70%, 80% e 90%, seguido de dois banhos de 1 hora em álcool absoluto (100%).

Em continuação no preparo histotécnico, o material foi diafanizado pela imersão em xilol, em duas ou três passagens (banhos), cada qual com 1 hora de duração. O xilol é miscível tanto em álcool, quanto em parafina; removendo-se o



álcool por completo e tornando o tecido em condições de ser impregnado pela parafina. Retirou-se o excesso de xilol com papel filtro e as peças foram colocadas em frascos contendo parafina líquida (Merck KGaA - Alemanha) à temperatura média de 60° C em estufa, durante 2 horas. Deste modo, a parafina penetrou, de modo gradual, nos tecidos, deslocando o xilol, ao mesmo tempo em que ocorreu a evaporação deste à temperatura da estufa.

Quando a infiltração se completou, procedeu-se a inclusão das peças. Estas foram removidas da estufa e posicionadas no centro de uma forma metálica para inclusão em parafina, de acordo com o sentido dos cortes histológicos a serem realizados, ou seja, com a face vestibular dentária encostada no fundo da forma, a fim de obterem-se secções longitudinais das raízes dos primeiros molares superiores.

A partir disso, realizou-se a embebição, vertendo-se a parafina líquida sobre os espécimes, sendo esta solidificada à temperatura ambiente, formando um bloco de parafina com a peça localizada em seu interior. Os blocos tiveram suas arestas aparadas e foram levados ao micrótomo, onde realizaram-se cortes de 5 µm de espessura. As fitas obtidas dos blocos foram recolhidas em lâminas de vidro silanizadas, sendo colocadas duas em cada lâmina. As lâminas foram levadas em posição vertical para a estufa de secagem durante o período de 1 hora, tendo sido destinadas à evidenciação por imunofluorescência de OPN e integrina  $\alpha\beta_3$ , assim como para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e hematoxilina e eosina (HE).

### 3.4.1 TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

A desparafinização das fitas nas lâminas foi realizada através de permanência em estufa 56°C por 30 minutos, mergulhando-as, em seguida, em três banhos de xilol de 2 minutos cada. Posteriormente procedeu-se a hidratação dos cortes em concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 70%), cada qual durante 3 minutos, finalizando com água destilada por 5 minutos.

Todos os cortes foram banhados com PBS, pH 7.4, por 2 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio a 3% durante 15 minutos em câmara úmida. Após duas lavagens sucessivas por 5 minutos em PBS, realizou-se a recuperação antigênica com tampão citrato pH 6 a 95°C por 15 minutos. Nova lavagem foi realizada com PBS por 5 minutos. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com solução de albumina sérica bovina a 3% em PBS, pH 7.4, por 20 minutos. Um dos cortes de cada lâmina foi incubado com anticorpo policlonal anti- $\beta$ 3 (goat polyclonal IgG SC 6627, Santa Cruz BiotechnologyTM), diluído 1:50 em PBS e 0,1% soro fetal bovino ou anticorpo monoclonal anti-OPN (mouse monoclonal IgG SC 73631, Santa Cruz BiotechnologyTM), diluído 1:100 em PBS e 0,1% soro fetal bovino por, no mínimo, 12 horas. O outro corte, correspondente ao controle negativo, foi incubado em PBS.

Subsequentemente, procedeu-se 3 lavagens, de 5 minutos cada, em PBS e incubação de todos os cortes com o anticorpo secundário, na diluição de 1:100 em PBS por 60 minutos. Os anticorpos secundários utilizados foram o anti-IgG de cabra produzido em coelho (Zymed 81-1640) para marcação anti- $\beta$ 3 e anticorpo

biotinilado universal ( kit Dako™ LSAB K0690) para marcação anti-OPN. Lavou-se 3 vezes por 5 minutos em PBS.

A marcação em fluorescência seguiu com incubação com estreptavidina associada ao fluoróforo FITC, na diluição de 1:200 em PBS por 60 minutos. Posteriormente, lavou-se com PBS 3 vezes por 5 minutos e realizou-se a marcação dos núcleos celulares em fluorescência com DAPI, na diluição de 1:50 em PBS, sendo colocado e removido logo em seguida. Nova lavagem foi realizada com PBS e as lâminas foram montadas com N- propilgalacto, sendo a vedação feita com esmalte incolor. Estas etapas foram realizadas ao abrigo da luz e as lâminas foram mantidas congeladas a -80° celsius.

### **3.4.2 TÉCNICA PARA MARCAÇÃO DE TRAP POR FLUORESCÊNCIA**

A partir das lâminas desparafinizadas, os cortes foram incubados com solução preparada com reagentes contidos no kit *Acid Phosphatase Leucocyte* (Sigma Aldrich™ 387A): tampão acetato, nitrito de sódio, tartarato e o agente fluoróforo *ELF97 phosphatase substrate* (Invitrogen™ E6589) em água miliq por 15 minutos, seguindo-se a lavagem com PBS, por duas vezes de um minuto cada, e a contracoloração com DAPI 1:50, lavando-se logo em seguida. As lâminas foram montadas conforme descrito para a técnica da imunofluorescência.

### **3.4.3 TÉCNICA DE HEMATOXILINA-EOSINA**

A coloração com hematoxilina-eosina foi realizada após a desparafinização das fitas e hidratação dos cortes, como descrito previamente. A princípio, foi

realizada a imersão em hematoxilina durante 3 a 5 minutos, sendo as lâminas enxaguadas em água corrente por 5 minutos e mergulhadas, rapidamente, em solução de ácido clorídrico a 1% diluído em álcool 70%. A seguir, foram imersas em eosina durante 1 a 3 minutos e enxaguadas, novamente, em água corrente, por 3 passagens rápidas. Seguiu-se a desidratação sequencial em banhos de álcool em concentração crescente (70%, 80%, 90%, e 100%), bem como a clarificação com dois banhos de xilol. As lâminas foram cobertas por lamínulas montadas com Entellan Novo (Merck – Alemanha).

#### **3.4.4 TÉCNICA DA REAÇÃO TRANSCRIPTASE REVERSA EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR)**

Após dissecação e divisão das maxilas dos grupos Experimental (n=21) e Controles (n=18), as áreas correspondentes ao primeiro molar superior esquerdo foram separadas, congeladas em nitrogênio líquido e trituradas com gral e pistilo. Em seguida adicionou-se 1ml de trizol (Invitrogen Life Technologies Inc), coletando o material para seus respectivos tubos eppendorfs.

A extração de RNA foi feita segundo as instruções do fabricante e o RNA total obtido foi quantificado através de espectrofotometria UV a 260 nm. A quantidade de 2 µg do RNA total extraído foi tratada com RQ1 DNase (Promega), conforme o protocolo do fabricante. O RNA foi incubado com 5 M de LiCl na concentração final de 2,5 M a -70°C por 16 hs e, em seguida, centrifugado a 14000 *rpm* por 15 min a 4°C. O pellet foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 14000 *rpm* por 15 min a 4°C. Após a evaporação do etanol 70%, o pellet foi ressuspendido em água. O RNA total obtido após a precipitação com LiCl foi

usado na síntese de cDNA utilizando o sistema “M-MLV Reverse Transcriptase” (Promega), seguindo o protocolo do fabricante.

Amplificou-se o cDNA pela reação em cadeia polimerase (PCR), utilizando os reagentes do Kit “GoTaq® Flexi DNA Polymerase” (Promega): 0,4 µM de cada par de iniciadores específicos, 0,75 U/µL de GoTaq Flexi DNA polimerase (Promega), 0,12 mM de mix de nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1x de tampão GoTaq Flexi.

As condições da reação foram as seguintes: 95°C por 5min (hot start) e 40 ciclos compreendendo 95°C por 45s, 52°C por 30s, 72°C por 30s e 72°C por 7 minutos. Os seguintes primers foram utilizados para amplificar as subunidades de cDNA de osteopontina, de cDNA de osteoprotegerina e de cDNA de F4/80 de *Rattus norvegicus*: osteopontina, senso GAAACTCTTCCAAGCAACTCC e antisenso GACTGTGGGGGCGATTGGAG; osteoprotegerina, senso CATACTACTTTCCCAAACCGTC e antisenso CAACTGCCATTTCAAGAGCCG; F4/80, senso CTCCAGCACATCCAGCCAA e antisenso TTCTACAGTCTCACAGCCCGA. Primers para o gene housekeeping gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram utilizados para validar o cDNA em cada reação: senso, AGATCCACAACGGATACATT, e antisenso, TCCCTCAAGATTGTCAGCAA. Realizou-se eletroforese com o produto amplificado do PCR em um gel de 1,5% de agarose e visualizou-se por exposição UV em um transiluminador.

A comparação semi-quantitativa entre as amostras foi feita através da medição das intensidades das bandas correspondentes aos fragmentos amplificados com o programa Image J 1.334s (WayneRasband, NIH, EUA - <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

### **3.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO**

Os valores correspondentes a guanilato ciclase solúvel do RNA-m para F4/80, OPN e OPG foram avaliados em relação aos níveis de RNAm do gene housekeeping GAPDH e os dados resultantes foram convertidos em gráficos e submetidos ao teste t de Student para avaliação da significância estatística, utilizando o programa SPSS 13 (SPSS Inc, Chicago, Ill).

## **4 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA**

### **4.1 ARTIGO**

#### **EXPRESSION OF OSTEOPONTIN, $\alpha$ V $\beta$ 3 INTEGRIN AND TRAP IN ROOT RESORPTION INDUCED BY EXPERIMENTAL ORTHODONTIC FORCE REACTIVATION**

Artigo a ser submetido ao Journal of Dental Research

Antonio de Moraes Izquierdo – Doutorando e Mestre em Odontologia (Ortodontia)

- Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Jorge José de Carvalho – Doutor em Histologia – USP, Professor Associado e

Chefe do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia

Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro –

IBRAG/UERJ

Matilde da Cunha Gonçalves Nojima – Pós-Doutora - Case Western Reserve

University, Mestre e Doutora em Odontologia (Ortodontia) - UFRJ, Professora

Adjunta de Ortodontia do Departamento de Ortodontia e Odontopediatria da

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Thereza Christina Barja-Fidalgo – Pós-Doutora – Universidade de Montreal,

Doutora em Ciências Biológicas (Biofísica) – UFRJ, Professora Associada do

Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia Roberto Alcântara  
Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – IBRAG/UERJ

**Correspondence to:**

Thereza Christina Barja-Fidalgo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro – IBRAG/UERJ

Av. 28 de Setembro, 87 – fundos – 5º Andar – Vila Isabel

Rio de Janeiro – RJ – CEP 20551-030

E-mail: [barja-fidalgo@uerj.br](mailto:barja-fidalgo@uerj.br)



## **Abstract**

**Introduction:** This investigation analyzed the effects of experimental orthodontic force reactivation in *Wistar* rats' tooth root surface. **Methods:** a coil spring was installed and activated to induce mesial movement of the upper first molar of 42 rats, and reactivated at 21 and 42 days (experimental group, E). The control group consisted of 36 animals, 18 of which without coil springs (Cs, n=18) and 18 with coil springs installed though not activated (Cc, n=18), thus neither experiencing orthodontic tooth movement. Time interval from the start of the experiment until sacrifice differed between 21, 42 and 63 days, according to each subgroup. Histological preparations were made for HE staining, immunofluorescence reaction for TRAP to detect clastic activity, and also for OPN and  $\alpha\beta3$  integrin expression. The genic expression for F4/80, OPN and OPG were assayed by RT-PCR using tissue samples of the teeth's roots. **Results:** Histological analysis showed an increase in clastic activity, evidenced by the presence of resorption gaps on the mesial root surface close to the apical third, the side of pressure, and by TRAP marking in all experimental subgroups. F4/80 genic expression increased significantly at day 21 (E21) and remained high, despite the drop at day 42 (E42). Histological sections demonstrated OPN and  $\beta3$  integrin associated with the root resorption gaps in all experimental subgroups, although to a higher extent at day 21 for both proteins. An increased expression of OPN-mRNA was observed only in subgroup E21, supporting the histological findings.

OPG's genic expression signaled a late increase, with a statistical difference found only in subgroups E42 and E63. Areas of root resorption could not be found in control subgroups with and without the coil spring, histological markers for TRAP, OPN and  $\beta 3$  integrin showed strictly physiological activity next to bone; F4/80, OPN e OPG expression supported the histological findings. Results show that  $\beta 3$  integrin, OPN and F4/80 expression can be associated with clastic activity in root resorption gaps following induced tooth movement.

**Key words:** orthodontic tooth movement, OPN, integrin, F4/80, OPG

## Introduction

Root resorption can be described as the partial loss of cement and dentin from the root surface of the tooth (Pizzo et al., 2007) and it represents one of the most common unwanted side-effect following orthodontic treatment. (Brezniak and Wasserstein, 2002a; b) Clasts are responsible for the resorption of mineralized tissue. (Fujikawa et al., 2001)

Osteoprotegerin (OPG) and receptor-activator of NF $\kappa$ B ligand (RANK-L) are key regulators in bone remodelling. RANK-L is essential to clast formation, fusion, activation and survival, while OPG inhibits its function while keeping it from binding to the NF $\kappa$ B (RANK) receptor-activator and stopping macrophages to assume the phenotype of clasts.

The formation of a sealing zone is essential to clast polarization because it acts as a barrier to diffusion, isolates the ruffled border and allows for a directed secretion of acids, such as tartrate resistant acid phosphatase (TRAP), and lysosome enzymes such as cathepsin K. (Denhardt and Guo, 1993) TRAP is considered the main marker for clastic activity. (Brudvik, 1992; Cole and Walters, 1987; Figueira, 2004; Hayman and Cox, 2003; Minkin, 1982)

Recognition of the extracellular components of mineralized tissues such as osteopontin (OPN) by clasts, is an important step in the functional initiation of this cell. (Blair and Zaidi, 2006; Denhardt and Guo, 1993; Dolce et al., 2003; Nakamura et al., 2007)

OPN is related to promoting and regulating adhesion, as well as to distribute osteoclasts over bone surface during resorption. (Chung et al., 2008; Terai et al., 1999) Osteoclastic attachment to the bone matrix is facilitated by integrin receptors.  $\alpha\beta 3$  integrin is the main attachment receptor present in the cell

membrane and interacts with proteins in the bone matrix, especially OPN, via the specific amino acid motif Arginine-Glycine-Aspartic acid, present in such proteins. (Fisher et al., 1993; Flores et al., 1992; Talic et al., 2006; Yamamoto et al., 1998)

The firm and stable attachment of the clast to the bone matrix is called sealing zone or ring. Substances capable of interfering with this adhesion could be used therapeutically in the control and treatment of bone and tooth resorption.

However, while searching for these therapeutic targets, the need for an increased comprehension of the timely distribution and functional aspects of cells and mediators that regulate the process of sealing and resorption becomes apparent.

The importance of integrin  $\alpha\beta 3$  and OPN to bone resorption has been described. (Fisher et al., 1993; Flores et al., 1992; Talic et al., 2006; Yamamoto et al., 1998) However, there is a lack of evidence concerning their role in the root resorption process following orthodontic movement. Once established the mechanism through which the integrins interact under such condition, this receptor and its ligands can become important pharmaceutical targets for prevention treatment of root resorptions, as well as promote an increase in orthodontic anchorage.

## **Materials and Methods**

Seventy eight male *Wistar* rats (*Rattus norvegicus*) weighing about 300 g each, were used in this study. The animals were housed in standard cages, six per cage, under controlled temperature (22° C), with a 12-hour light, 12-hour dark cycle; chow and mineral water were available *ad libitum*. (Izquierdo et al., 2012) All the undertaken procedures were approved by the Ethical Committee for Animal

Research of the Roberto Alcântara Gomes Biology Institute, of the State University of Rio de Janeiro (UERJ), and were performed according to the standards of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). There was no need for acclimatization since animal birth and experiment were carried out within the same conditions.

The experiment lasted 63 days. The rats were divided into three groups: control group without coil spring (Cs), control group with un-activated coil spring (Cc) and experimental group (E), with 3 subgroups of 6 animals each within the control group and 3 subgroups of 14 animals each within the experimental group. Time span from the start of the experiment until sacrifice differed between subgroups, set at 21, 42 and 63 days (E21, E42, E63, Cs21, Cs42, Cs63, Cc21, Cc42 and Cc63). A coil spring was bound to the upper left first molars and activated in all animals of Group E, and was reactivated after 21 and 42 days, according to the pertaining subgroup. Group Cs did not have an appliance installed, while Group Cc had an appliance installed though not activated (Figure 1).

All animals were sedated by intraperitoneal injection of ketamine (1,33ml/kg) and xylazine (0,67ml/kg) for orthodontic bonding of devices. In order to induce mesial tooth movement of the upper left first molar, a 7 mm NiTi closed coil spring (Morelli® ref.35.20.064) was tied to the cervical region of its crown with a stainless steel wire. A horizontal cervical sulcus was made around the upper incisors with a round diamond bur. The coil spring was stretched by another thread of stainless steel wire to produce a force of 50 cN, tied to the upper incisors and bonded with composite resin to prevent trauma to the surrounding tissues. The lower incisors were cut to prevent the displacement of the device.

After 21, 42 and 63 days of orthodontic tooth movement, rats were sacrificed by carbon dioxide asphyxiation. The tissues were harvested for analysis.

The left hemi-maxilla was removed, dissected, and bone and root tissues of the upper first molar were frozen in liquid nitrogen and were either homogenized with a mortar and a pestle for later RNA extraction, or kept in fixative with 10% paraformaldehyde and sodium cacodylate buffer, pH 7.2 for 24 hours, and decalcified in 10% EDTA, pH 7.4 for approximately 8 weeks. These specimens were then embedded in paraffin and parasagittal sections of 5  $\mu$ m of the teeth were taken histological analysis (immunofluorescence - OPN and  $\beta$ 3, TRAP staining and hematoxylin-eosin staining).

#### RNA extraction and PCR analysis

High-quality total ribonucleic acid (RNA) was isolated by a method modified from that described by Low *et al.* (2005). Trizol (Invitrogen Life Technologies Inc) was used to isolate total RNA. Total RNA was quantified using UV spectrophotometry at 260 nm. After DNase treatment (RQ1 RNase-Free DNase, Promega), total RNA (2.0  $\mu$ g) was reverse-transcribed into cDNA using Moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase and oligo (dT) 15 primer (Promega). cDNA were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with GoTaq® Flexi DNA Polymerase kit (Promega). Reaction conditions were as follows: 95°C for 5min (hot start) and 40 cycles comprising 95°C for 45 sec, 52°C for 30 sec, 72°C for 30 sec and 72°C for 7 min. The following primers were used to amplify *Rattus norvegicus* osteopontin subunit cDNA: forward, GAAACTCTTCCAAGCAACTCC, and reverse, GACTGTGGGGGCGATTGG; osteoprotegerin subunit cDNA, forward CATACTACTTTCCCAAACCGTC, and reverse, CAACTGCCATTTCAAGAGCCG; and F4/80 subunit cDNA, forward,

CTCCAGCACATCCAGCCAA, and reverse TTCTACAGTCTCACAGCCCGA. The housekeeping gene glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) primers were used to validate the cDNA in each reaction: forward, AGATCCACAACGGATACATT and reverse, TCCCTCAAGATTGTCAGCAA. PCR products underwent electrophoresis in a 1.5% agarose gel and visualized by UV exposure on a transilluminator. The semiquantitative comparison between the samples was carried out by measuring the intensities of the bands corresponding to the amplified fragments, using Image J 1334s software. The values corresponding to soluble guanylate cyclase mRNA were compared to mRNA levels of the housekeeping gene GAPDH. Data was converted into graphics and submitted to Student's t statistical test with a significance level of 5%.

#### Immunofluorescence and TRAP staining

Tissue sections were deparaffinized and rehydrated in graded solutions of ethanol (100%,90% and 70%) for 3 minutes each. The sections were washed in distilled water for 1 minute, and then the slides were placed in phosphate-buffered saline (PBS) solution, pH 7.4. for 2 minutes. The sections were placed in 3% hydrogen peroxide to quench the endogenous peroxidase for 15 minutes. After washing in 2 changes of PBS, antigen retrieval was performed with citrate buffer, pH 6 at 95°C for 15 minutes. Non-specific background reaction was blocked by 3% bovine serum albumin in PBS pH 7.4 for 20 minutes, then the sections were incubated overnight with the primary polyclonal antibody anti- $\beta$ 3 integrin and monoclonal antibody anti-osteopontin (sc-6627; sc-73631 respectively, Santa Cruz Biotechnology™). The slides were washed in 3 changes of PBS for 5 minutes each and incubated with secondary antibody (rabbit anti-goat IgG-Zymed 81-1640) for

$\beta$ 3 integrin and universal biotinylated antibody (Dako™LSAB K0690) for osteopontin for 60 minutes, followed by 3 changes of PBS of 5 minutes each.

Streptavidin conjugated with FITC (fluorescein isothiocyanate) was applied to the sections, 1:200 dilution in PBS for 60 minutes and washed in 3 changes of PBS for 5 minutes each. Cellular nuclei were marked with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 1:50 dilution in PBS for 30 seconds, then the slides were washed with PBS and blotted to remove the excess fluid around the sections. Finally, the sections were mounted with fluorescent mounting medium and the coverslip edges sealed with clear nail polish and stored at -20°C in the dark. Negative controls were labeled with the same procedures but omitting the incubation with primary antibodies.

TRAP staining, which is regarded as an osteoclast activity marker, followed the method described by Filgueira (2004). (Filgueira, 2004) Sections were incubated with a solution of 110mM acetate buffer, pH 5.2, 1.1 mM sodium nitrite, 7.4 mM tartrate from the *Acid Phosphatase Leucocyte Kit* (Sigma Aldrich™ 387A) and 5 mM from the *ELF 97 phosphatase substrate* (Invitrogen™ E6589). After 15 minutes, the slides were rinsed in 2 changes of PBS for 1 minute each and counterstained with DAPI 1:50 dilution in PBS for 30 seconds, then washed again in PBS. At the end of the process, sections were mounted in the same way as for immunofluorescence.

## Results

In the experimental model chosen for our study, adult rats' teeth were submitted to orthodontic forces after NiTi coil springs were installed and activated with the aim of moving the upper left first molars mesially for periods of 21 days



(subgroup E21), 42 days (subgroup E42) and 63 days (subgroup E63). Reactivation of the coil springs was carried out after 21 days in subgroups E42 and E63, and again after 42 days in subgroup E63. Therefore subgroup E21 underwent one activation, while subgroups E42 and E63 underwent two and three activations, respectively. After this period the effects of prolonged orthodontic movement on the root surface were evaluated microscopically.

In all studied subgroups, histological analyses showed that mesial movement of the upper first molars generated areas of tension mostly on the distal surface of the roots, and areas of compression mostly on the mesial surface (Figure 2). After 21 days and only one spring activation, the formation of resorption gaps on the mesial surface of the root close to its apical third could be observed (Figure 3A), as well as bone resorption in the neighboring region, when compared to the same frames of observation of animals in the control groups (Figure 3B and 3C). This becomes progressively more evident in experimental specimens of subgroups E42 and E63, which were exposed to one or two extra cycles of orthodontic activation, respectively.

Once observed that the apical third of the mesial root surface was most affected by the application of continue orthodontic forces, the study aimed to identify inflammatory markers of this specific area that could be implied in the process of resorption.

An intense inflammatory response and a leukocyte infiltrate was evidenced in all experimental subgroups, especially in specimens of subgroup E63.

Experimental animals submitted to one activation and observation after 21 days (E21), sections stained with hematoxylin and eosin (Figure 3A) display areas of mild to moderate root resorption, with the presence of an eventual clast next to

the root and bone surfaces. A break in the cementoblast lining over the root surface was also observed. The periodontal ligament area was characterized by loose connective tissue with a high concentration of cells.

After 42 days and two cycles of orthodontic activation, animals in subgroup E42 presented areas of mild to moderate root resorption, with osteoclasts adjacent to the surface of the root and bone. (Figure 3D).

After 63 days and three cycles of tooth movement (E63), the areas of root resorption in the apical and mid-thirds were more extensive than in subgroups E21 and E42, with osteoclasts attached to root and bone surfaces, and evidence of repair zones of cementoid tissue deposition over the root surface (Figure 3G).

Sections stained with HE of control subgroups with the coil spring (Cc21, Cc42 and Cc63) (Figure 3B, E and H) and without the coil spring (Cs21, Cs42 and Cs63) (Figure 3C, F and I), did not display any area of root resorption. The cementoblast layer (C) was intact and uninterrupted, the periodontal ligament (PL) connective tissue displayed all signs of normality, and isolated clasts (CLT) were observed in the bone trabeculae adjacent probably as a result of physiological bone remodeling.

Histological sections were also marked for TRAP in order to evaluate clastic activity. Figure 4 (B, C, E, F, H and I) shows that control groups with and without coil spring (Cc21, Cc42, Cc63, Cs21, Cs42 and Cs63) did not present any TRAP-positive cells next to the root surface or within the periodontal ligament, throughout the experiment. A sparse sign of clastic activity was noted within bone (Figure 4E and 4H), suggesting physiological remodeling and thus supporting the observations taken from HE stained sections in the same subgroups (Figure 3C).

In contrast, experimental subgroups displayed TRAP-positive markings (green fluorescence) at 21 and 42 days (E21 e E42) on resorption gaps close to the root's apical third, as well as on adjacent bone (Figure 4A and D). At day 63 (E63), clastic activity was be observed in the same areas, as well as TRAP-positive gaps on the mid-third of the mesial root surface (Figure 4G).

F4/80 expression was analyzed in order to better specify inflammatory cell evidence on sites of intense root resorption, because of its action as a specific macrophage marker, as that seems to be the cell type infiltrated in the periodontal ligament (Figure 5). An increase in F4/80 expression was noted in the experimental group at day 21 (E21), which remained throughout the experiment (E42 e E63). F4/80 expression was prone to a decrease after 42 days (E42), despite its return to the previously observed levels (E21) after 63 days of activated spring.

Histological sections of teeth's roots were also analyzed by immunofluorescence for osteopontin (OPN) expression and for its receptor,  $\alpha\beta 3$  integrin (Figure 6 and 7), both related to bone remodeling and resorption. (Ross et al., 1993)

All experimental subgroups (E21, E42 and E63) marked positive for OPN e  $\alpha\beta 3$ . At day 21 (E21), more intense marking was noted for both proteins in the root resorption gaps on the mesial surface of the root and on the corresponding bone surface (Figure 6A and 7A). In the 42 day cycle (E42), OPN marking maintained the same level, however with less intensity, varying from mild to moderate (Figura 6D). After 63 days, OPN expression was a lot less intense and distributed over the area, with points of concentration on the borders of the root resorption gaps (Figure 6G).  $\alpha\beta 3$  marking remained the same throughout the

experiment (42 and 63 days), although less intense, especially in subgroup E42, and was also associated with resorption gaps (Figure 7D and 7G).

In the control subgroups (Cc21, Cc42, Cc63, Cs21, Cs42 and Cs63), there was no OPN or  $\alpha\beta 3$  marking on the root surface, only mildly in the adjacent tissues (Figure 6 B, C, E, F, H and I; Figure 7 B, C, E, F, H and I).

Figure 8 shows the analysis of OPN expression and reinforces the immunofluorescence findings for this protein. mRNA's osteopontin expression peaked at 21 days (E21), decreasing to values close to those found in each respective control subgroup (Cc21, Cc42, Cc63, Cs21, Cs42 and Cs63), in the remaining experimental subgroups (E42 e E63).

Due to the results detecting intense osteoclastic activity on the root resorption gaps, assays for analysis of osteoprotegerin (OPG) were carried out, considered to be a soluble inhibitor to osteoclastic maturation and activation. Figure 9 shows that after the first cycle (E21) as opposed to OPN, OPG expression exhibited low values similar to those found in the control group; nevertheless it displayed a significant increase after 42 days of tooth movement, ending the 63 days with a slight drop, although not returning to the initial values.

## **Discussion**

Root resorption in humans is more commonly observed along the apical third of teeth that have been moved orthodontically. Some authors have observed a different pattern of root resorption in rats and have suggested that the most compromised areas were mid and cervical root thirds. (Consolaro, 2005; Fernandes, 2008; Ren et al., 2004) However in the present work, the most affected region was the apical third of the mesial face of the root.

The resorptive phenomena progressed along the entire experiment, at 21, 42 and 63 days, with the presence of osteoclasts in the resorption gaps over the roots' mesial surface (Figure 3A, D and G) and of repair cementoid tissue very evident at day 63 (Figure 3G). In another studied carried out by our group, using similar methods and only one cycle of dental movement, histological analysis of tissues show that from the very first days after activating the coil spring (day 3 and day 7), the acute inflammation has set in, with an increase in marker expression., high TRAP activity, lasting until the 14th day.

Complementary marking techniques supported the observations derived from HE, within which the TRAP marker, characteristic of clastic activity. (Tsuboi et al., 2003) No TRAP markers were observed in the animals of the control groups (Figure 4B, C, E, F, H and I) nor were they identified within alveolar bone, which is compatible with physiological remodeling, where clasts are present in lamellar bone. (Fernandes, 2008; Filgueira, 2004; Yam and Janckila, 2003)

However in the experimental groups, TRAP marked positive throughout the whole experiment (Figure 4A, D and G). These findings point towards clastic activity and bone remodeling as a result of orthodontic force application on alveolar bone and periodontal ligament, as well as active resorption next to the root surface. Even after the end of each coil spring activation cycle, there was evidence of clastic activity, probably contributing to the resolution of the hyaline zone and the process of repair. (Brudvik and Rygh, 1994; 1995)

The presence of macrophages in tissues can be detected by the immunohistochemical analysis of markers such as F4/80, with increased expression in resident macrophages. (Chan et al., 1998; Leenen et al., 1994; Lloyd et al., 2008; van den Berg and Kraal, 2005; Vassiliou et al., 2010) The increase in

F4/80 expression throughout the experiment indicates an ongoing local inflammatory process. Despite a drop in F4/80 values at 42 days when compared to E21 and E63, they were not statistically different and are bigger than those found within the control group animals. This difference detected at day 42 can be due to differences within animals, or even a real change in leukocyte count at the local microenvironment as a result of a persistent inflammatory response and /or tissue repair response.

OPN is expressed by osteocytes, cementocytes, osteoblasts (Fernandes, 2008; Kuroda et al., 2005; Morinobu et al., 2003; Terai et al., 1999), and contains a glycine-arginine-aspartic acid motif that when recognized by the  $\alpha\beta 3$  integrin expressed by osteoclasts mediates cellular adhesion, and thus posing a chemotactic effect in osteoclast recruitment. OPN plays an important role in promoting and regulating osteoclast adhesion and spreading over mineralized surface during resorption.(Denhardt et al., 2001)

OPN expression was more strongly evidenced over tooth and bone surfaces, especially in subgroup E21, but also in the other experimental subgroups (E42 and E63), and on the periodontal ligament. In the control groups there was minimal OPN marking, which can be justified by the fact that it can be found in the extracellular matrix of bone, cement and dentin, taking part in bone remodeling, dentinogenesis and cementogenesis. (Bosshardt et al., 1998; Bronckers et al., 1994; Nanci, 1999; Takano-Yamamoto et al., 1994)

A study found that the phosphatase in TRAP-enzyme is closely related to the bioactivity of OPN due to desphosphorilation.(Andersson et al., 2003) OPN would act as a multifunctional protein in bone resorption and formation, as well as in tooth resorption under mechanical stress.(Denhardt et al., 2001)

Terai and collaborators (1999) observed that some cells that marked positive for TRAP did not display the same result when it came to OPN, and concluded that osteoclasts mark positive for OPN only when in contact with bone. (Kuroda et al., 2005; Terai et al., 1999). Kuroda and collaborators (2005) observed the same regarding osteoclast contact to tooth surface and OPN expression. (Kuroda et al., 2005) These findings strongly relate OPN expression with the resorptive activity of osteoclasts.

OPN's genic expression supports the immunofluorescence findings. There was an expressive increase at 21 days (E21), and decreased in the remaining experimental groups (E42 and E63) to values similar to those found in the respective control groups (Cc21, Cc42, Cc63, Cs21, Cs42 and Cs63).

Osteoclasts interact with OPN via  $\alpha\beta 3$  integrin in order to bond to the matrix of calcified tissue. A previous study showed that its absence won't keep osteoclasts from proliferating, but it will hamper its function. (Matsuo and Irie, 2008) The results for  $\alpha\beta 3$ -integrin immunofluorescence displayed the same marking pattern as observed with osteopontin, supporting data found in the literature that indicate an interaction between both in the process of cellular adhesion to the mineralized surface. (Fernandes, 2008; MacNeil et al., 1995a; MacNeil et al., 1995b; Nakamura et al., 2007)

The osteoblast expresses RANKL which binds to RANK (its receptor) on osteoclast's surface. This enables precursors to differentiate into multinuclear osteoclasts, activate and survive. Osteoprotegerin (OPG) is secreted by osteoblasts and stem cells and protects the skeleton from excessive resorption by binding to RANKL and preventing it from interacting with RANK. OPG blocks the mature osteoclast's activation in a reversible manner. This is known as

RANKL/RANK/OPG system. The RANKL/OPG ratio is a determining factor for bone mass and skeletal integrity. (Boyce and Xing, 2007; Feige, 2001)

The analysis of osteoprotegerin's genic expression supported previous findings when it displayed low values after the first cycle of activation (E21), similar to those found in the control subgroups, then rising significantly after 42 days and 63 days of tooth movement, which would correspond to balance maintenance in the RANKL/RANK/OPG system.

## Conclusion

The results showed that tooth movement induced by successive cycles of activation of orthodontic appliance maintained the pro-inflammatory response, with increased expression of proteins related to osteoclastogenesis and resorption, resulting in the accumulation of macrophages and osteoclasts in areas of compression and increasing areas of root resorption.

## References

- Andersson G, Ek-Rylander B, Hollberg K, Ljusberg-Sjolander J, Lang P, Norgard M, et al. (2003). TRACP as an osteopontin phosphatase. *J Bone Miner Res* 18(10):1912-5.
- Blair HC, Zaidi M (2006). Osteoclastic differentiation and function regulated by old and new pathways. *Rev Endocr Metab Disord* 7(1-2):23-32.
- Bosshardt DD, Zalzal S, McKee MD, Nanci A (1998). Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum. *Anat Rec* 250(1):13-33.
- Boyce BF, Xing L (2007). The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep* 5(3):98-104.
- Brezniak N, Wasserstein A (2002a). Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part II: The clinical aspects. *Angle Orthod* 72(2):180-4.
- Brezniak N, Wasserstein A (2002b). Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part I: The basic science aspects. *Angle Orthod* 72(2):175-9.



- Bronckers AL, Farach-Carson MC, Van Waveren E, Butler WT (1994). Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin, and dentin sialoprotein during dental root formation and early cementogenesis in the rat. *J Bone Miner Res* 9(6):833-41.
- Brudvik P, Rygh P (1994). Multi-nucleated cells remove the main hyalinized tissue and start resorption of adjacent root surfaces. *Eur J Orthod* 16(4):265-73.
- Brudvik P, Rygh P (1995). Transition and determinants of orthodontic root resorption-repair sequence. *Eur J Orthod* 17(3):177-88.
- Brudvik PR, P; Farrell, L ; Yen, E. (1992). Orthodontic root resorption: resorptive cell activity demonstrated by TRAP stain. *J Dent Res* 72(756).
- Chan J, Leenen PJ, Bertocello I, Nishikawa SI, Hamilton JA (1998). Macrophage lineage cells in inflammation: characterization by colony-stimulating factor-1 (CSF-1) receptor (c-Fms), ER-MP58, and ER-MP20 (Ly-6C) expression. *Blood* 92(4):1423-31.
- Chung CJ, Soma K, Rittling SR, Denhardt DT, Hayata T, Nakashima K, et al. (2008). OPN deficiency suppresses appearance of odontoclastic cells and resorption of the tooth root induced by experimental force application. *J Cell Physiol* 214(3):614-20.
- Cole AA, Walters LM (1987). Tartrate-resistant acid phosphatase in bone and cartilage following decalcification and cold-embedding in plastic. *J Histochem Cytochem* 35(2):203-6.
- Consolaro A (2005). Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. 2 ed. Maringá: Dental Press Editora.
- Denhardt DT, Guo X (1993). Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 7(15):1475-82.
- Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS (2001). Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 107(9):1055-61.
- Dolce C, Vakani A, Archer L, Morris-Wiman JA, Holliday LS (2003). Effects of echistatin and an RGD peptide on orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 82(9):682-6.
- Feige U (2001). Osteoprotegerin. *Ann Rheum Dis* 60 Suppl 3(iii)81-4.
- Fernandes LBD (2008). Expressão de Osteopontina e Integrina  $\alpha V\beta 3$  no Processo de Absorção Radicular Induzido por Movimentação Ortodôntica. Rio de Janeiro, Federal University of Rio de Janeiro.
- Filgueira L (2004). Fluorescence-based staining for tartrate-resistant acidic phosphatase (TRAP) in osteoclasts combined with other fluorescent dyes and protocols. *J Histochem Cytochem* 52(3):411-4.

- Fisher JE, Caulfield MP, Sato M, Quartuccio HA, Gould RJ, Garsky VM, et al. (1993). Inhibition of osteoclastic bone resorption in vivo by echistatin, an "arginyl-glycyl-aspartyl" (RGD)-containing protein. *Endocrinology* 132(3):1411-3.
- Flores ME, Norgard M, Heinegard D, Reinholt FP, Andersson G (1992). RGD-directed attachment of isolated rat osteoclasts to osteopontin, bone sialoprotein, and fibronectin. *Exp Cell Res* 201(2):526-30.
- Fujikawa Y, Sabokbar A, Neale SD, Itonaga I, Torisu T, Athanasou NA (2001). The effect of macrophage-colony stimulating factor and other humoral factors (interleukin-1, -3, -6, and -11, tumor necrosis factor-alpha, and granulocyte macrophage-colony stimulating factor) on human osteoclast formation from circulating cells. *Bone* 28(3):261-7.
- Hayman AR, Cox TM (2003). Tartrate-resistant acid phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res* 18(10):1905-7.
- Izquierdo AM, Mishima FD, Carrard VC, Farina M, Nojima MCG (2012). Effects of induced precocious puberty on cranial growth in female Wistar rats. *Eur J Orthod* 34(2):133-40.
- Kuroda S, Balam TA, Sakai Y, Tamamura N, Takano-Yamamoto T (2005). Expression of osteopontin mRNA in odontoclasts revealed by in situ hybridization during experimental tooth movement in mice. *J Bone Miner Metab* 23(2):110-3.
- Leenen PJ, de Bruijn MF, Voerman JS, Campbell PA, van Ewijk W (1994). Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 174(1-2):5-19.
- Lloyd CM, Phillips AR, Cooper GJ, Dunbar PR (2008). Three-colour fluorescence immunohistochemistry reveals the diversity of cells staining for macrophage markers in murine spleen and liver. *J Immunol Methods* 334(1-2):70-81.
- MacNeil RL, Berry J, D'Errico J, Strayhorn C, Piotrowski B, Somerman MJ (1995a). Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis. *Connect Tissue Res* 33(1-3):1-7.
- MacNeil RL, Berry J, D'Errico J, Strayhorn C, Somerman MJ (1995b). Localization and expression of osteopontin in mineralized and nonmineralized tissues of the periodontium. *Ann N Y Acad Sci* 760(166-76).
- Matsuo K, Irie N (2008). Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 473(2):201-9.
- Minkin C (1982). Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 34(3):285-90.
- Morinobu M, Ishijima M, Rittling SR, Tsuji K, Yamamoto H, Nifuji A, et al. (2003). Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo. *J Bone Miner Res* 18(9):1706-15.

- Nakamura I, Duong le T, Rodan SB, Rodan GA (2007). Involvement of alpha(v)beta3 integrins in osteoclast function. *J Bone Miner Metab* 25(6):337-44.
- Nanci A (1999). Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. *J Struct Biol* 126(3):256-69.
- Pizzo G, Licata ME, Guiglia R, Giuliana G (2007). Root resorption and orthodontic treatment. Review of the literature. *Minerva Stomatol* 56(1-2):31-44.
- Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM (2004). The rat as a model for orthodontic tooth movement--a critical review and a proposed solution. *Eur J Orthod* 26(5):483-90.
- Ross FP, Chappel J, Alvarez JI, Sander D, Butler WT, Farach-Carson MC, et al. (1993). Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J Biol Chem* 268(13):9901-7.
- Takano-Yamamoto T, Takemura T, Kitamura Y, Nomura S (1994). Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin, and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *J Histochem Cytochem* 42(7):885-96.
- Talic NF, Evans C, Zaki AM (2006). Inhibition of orthodontically induced root resorption with echistatin, an RGD-containing peptide. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 129(2):252-60.
- Terai K, Takano-Yamamoto T, Ohba Y, Hiura K, Sugimoto M, Sato M, et al. (1999). Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress. *J Bone Miner Res* 14(6):839-49.
- Tsuboi H, Matsui Y, Hayashida K, Yamane S, Maeda-Tanimura M, Nampei A, et al. (2003). Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 62(3):196-203.
- van den Berg TK, Kraal G (2005). A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction. *Trends Immunol* 26(10):506-9.
- Vassiliou I, Lolis E, Nastos C, Tympa A, Theodosopoulos T, Dafnios N, et al. (2010). The combined effect of erythropoietin and granulocyte macrophage colony stimulating factor on liver regeneration after major hepatectomy in rats. *World J Surg Oncol* 8(57).
- Yam LT, Janckila AJ (2003). Tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP): a personal perspective. *J Bone Miner Res* 18(10):1894-6.
- Yamamoto M, Fisher JE, Gentile M, Seedor JG, Leu CT, Rodan SB, et al. (1998). The integrin ligand echistatin prevents bone loss in ovariectomized mice and rats. *Endocrinology* 139(3):1411-9.

Groups \ Days	Days			
	0	21	42	63
Cs (18)	Θ(18)	Θ(12) †(6)	Θ(6) †(6)	†(6)
Cc (18)	Θ(18) Ø(18)	Θ(12) †(6)	Θ(6) †(6)	†(6)
E (42)	Θ(42) Ø(42) Φ(42)	Θ(28) Φ(28) †(14)	Θ(14) Φ(14) †(14)	†(14)

**Figure 1** Cronological description of the experiment

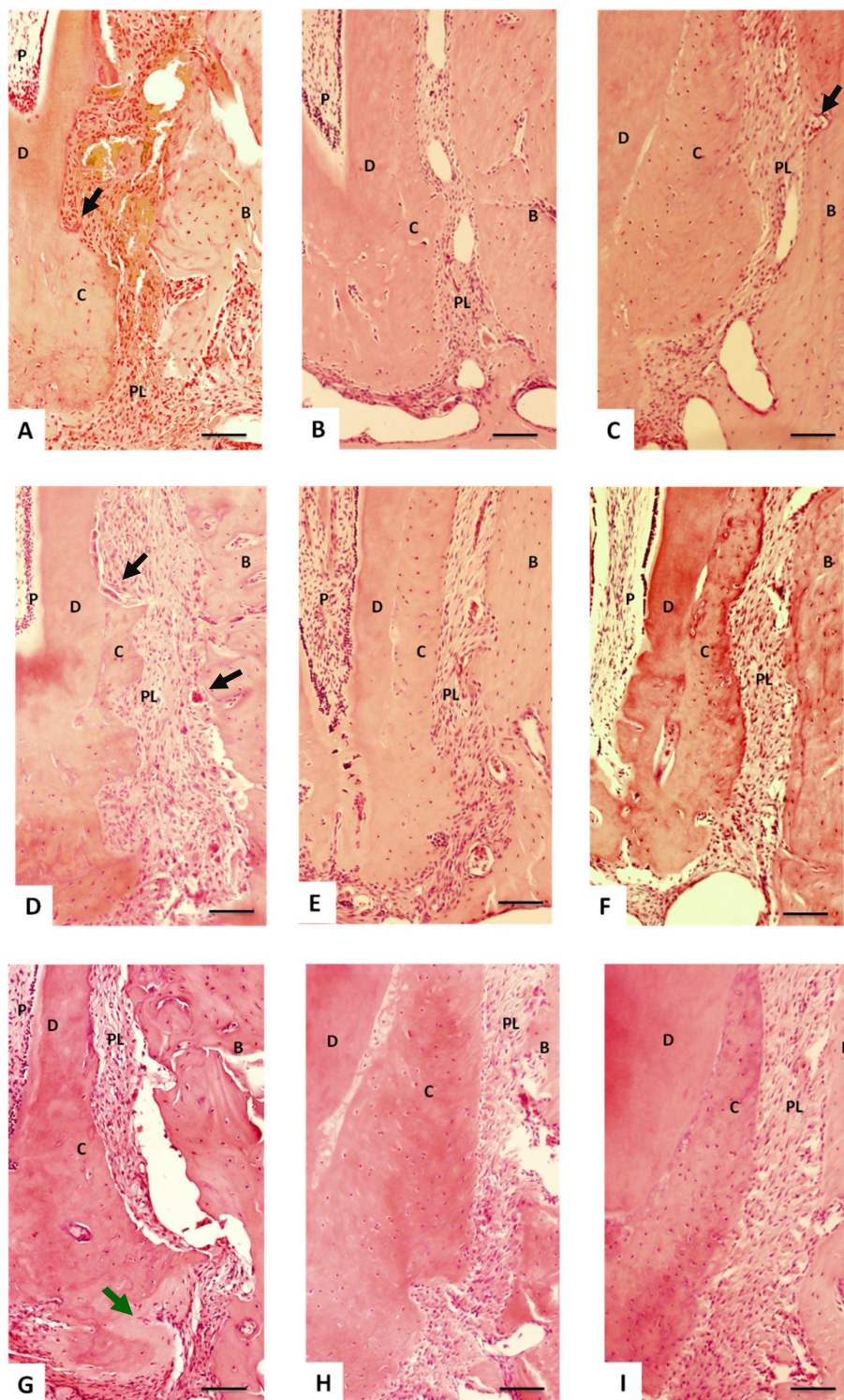
Θ = cutting of the lower incisors    † = sacrifice

Ø = coil spring installation    Φ = coil spring activation

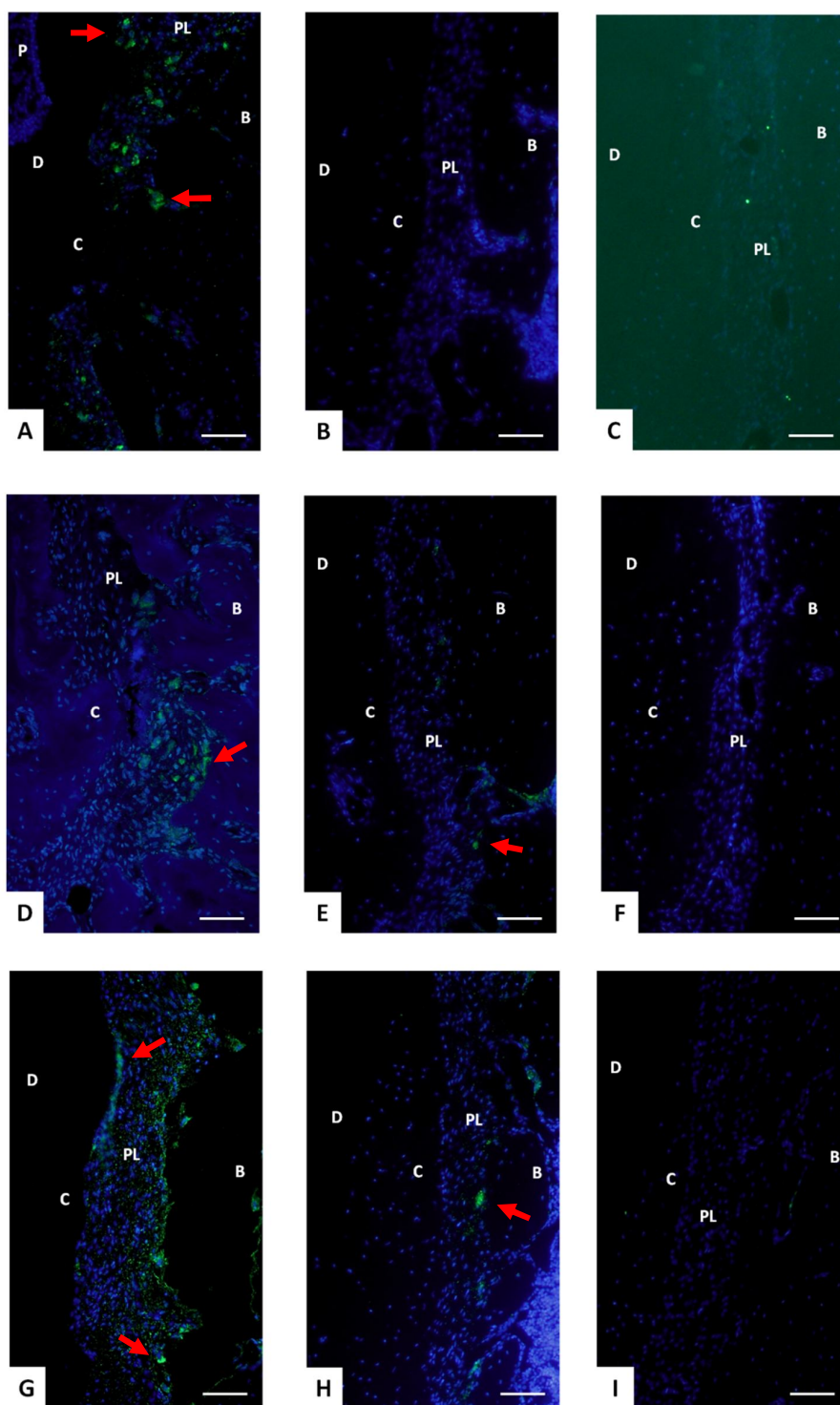
( ) = number of animals in each subgroup



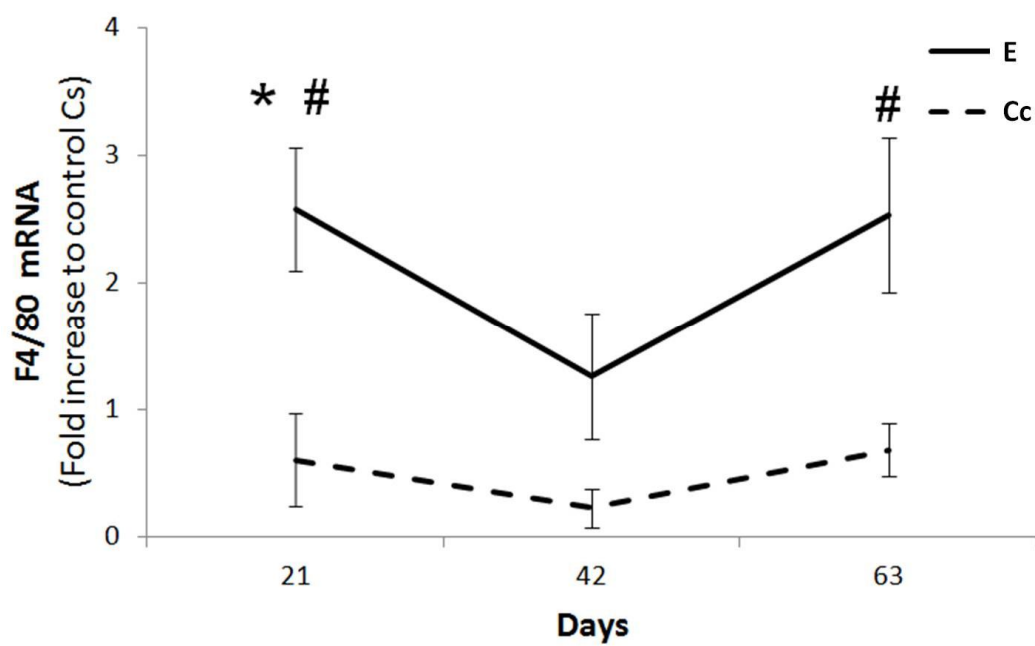
**Figure 2** Decalcified section illustrating detail to be examined in the other figures. **M** Mesial; **D** Distal. HE 10X. Scale = 100µm.



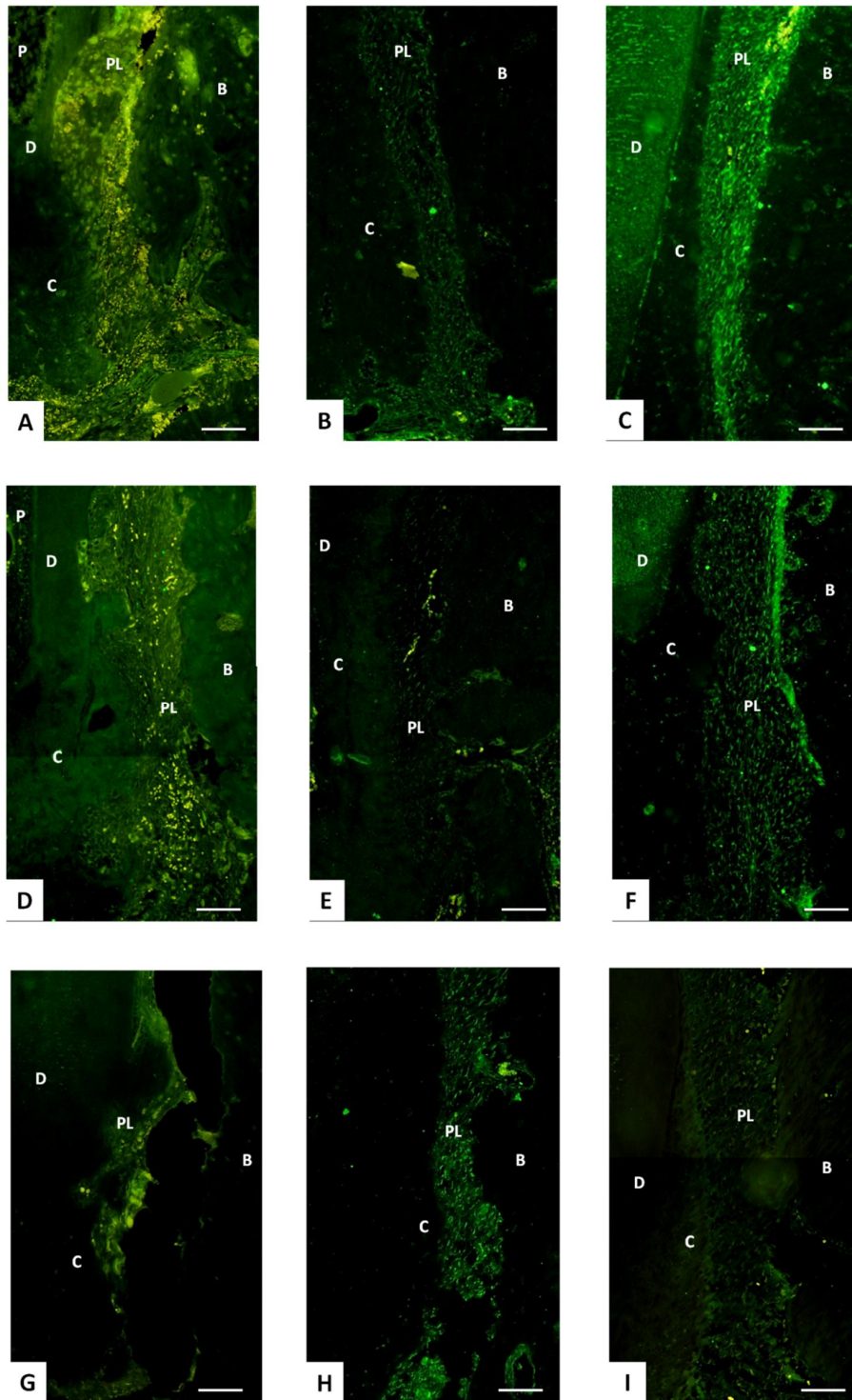
**Figure 3** Decalcified sections illustrating morphological characteristics of the teeth resorption for control and experimental groups. **P** Pulp; **D** Dentin; **C** Cementum; **PL** Periodontal Ligament; **B** Bone. HE 20X. Subgroups: **A** E21. **B** Cc21. **C** Cs21. **D** E42. **E** Cc42. **F** Cs42. **G** E63. **H** Cc63. **I** Cs63. Black Arrow = clasts. Green Arrow = repair zone. 100µm.



**Figure 4.** Decalcified sections illustrating morphological characteristics of the teeth resorption for control and experimental groups. **P** Pulp; **D** Dentin; **C** Cementum; **PL** Periodontal Ligament; **B** Bone. TRAP Fluorescence 20X. Subgroups: **A** E21. **B** Cc21. **C** Cs21. **D** E42. **E** Cc42. **F** Cs42. **G** E63. **H** Cc63. **I** Cs63. Red Arrow =TRAP deposition. Scale =100µm.

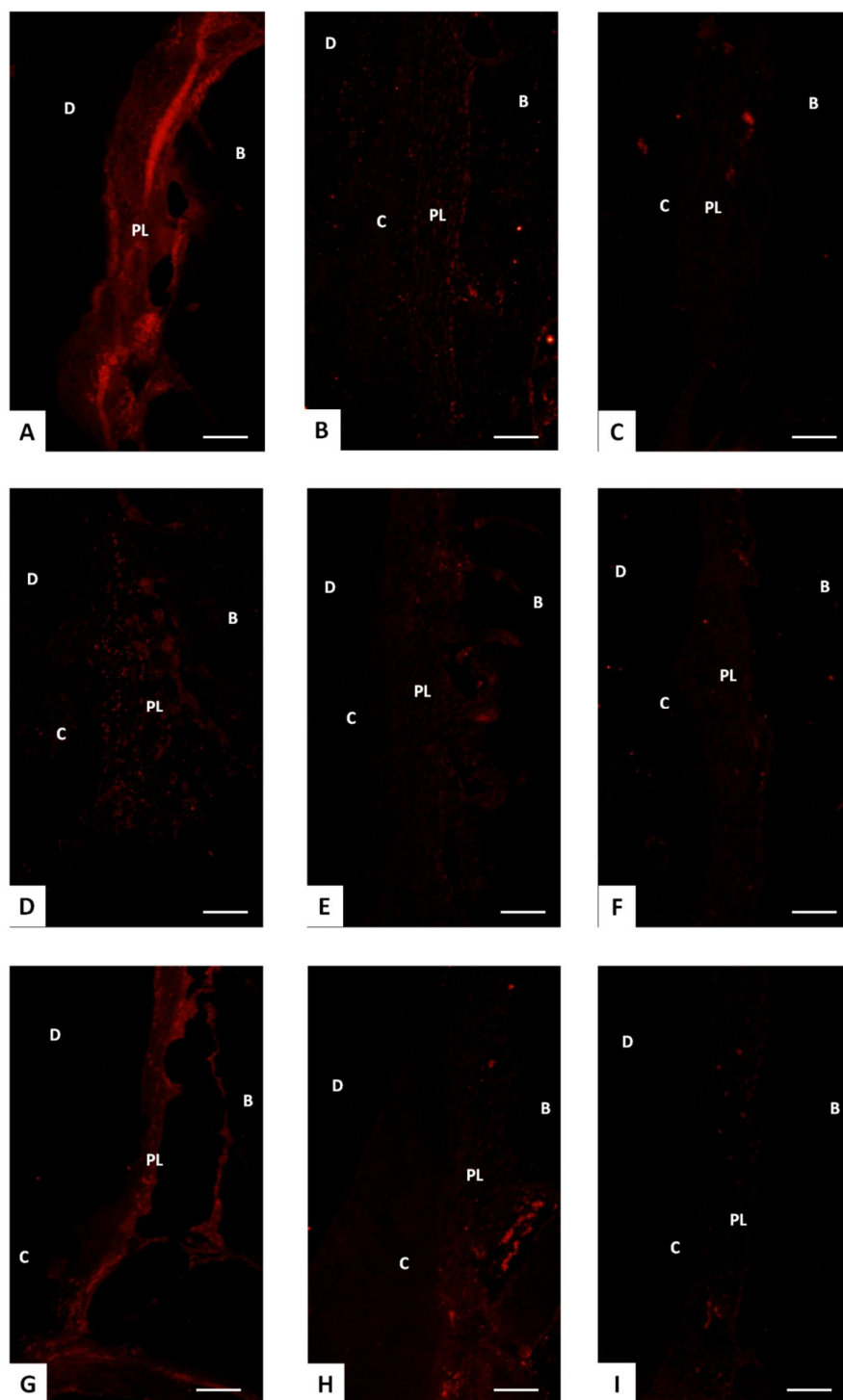


**Figure 5** Genic expression of F4/80.  $p < .05\%$  \* p vs Cs # p vs Cc

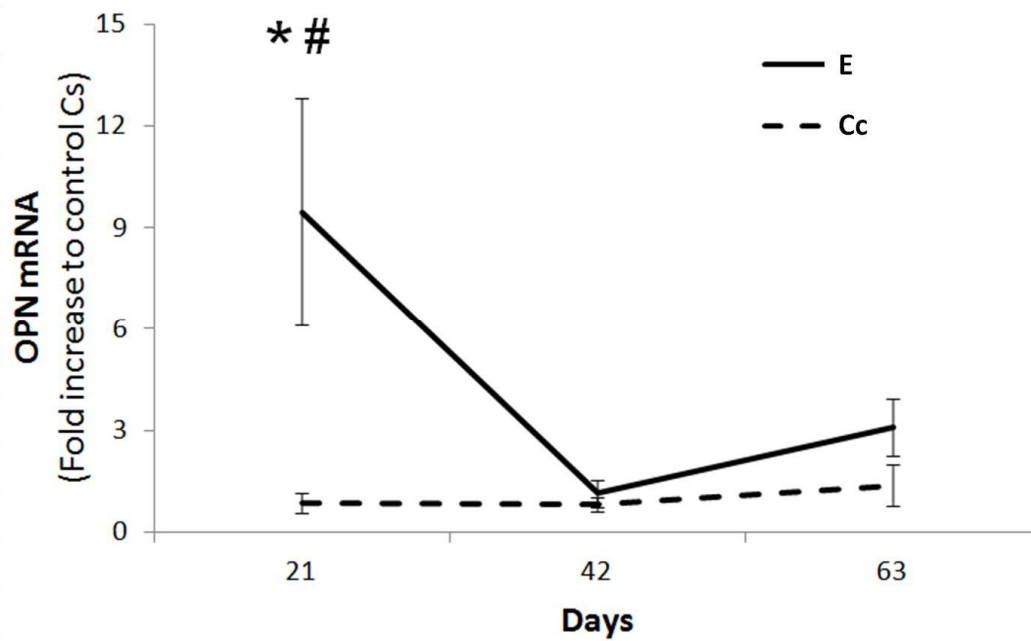


**Figure 6** Decalcified sections illustrating morphological characteristics of the teeth resorption for control and experimental groups. **P** Pulp; **D** Dentin; **C** Cementum; **PL** Periodontal Ligament; **B** Bone. OPN Fluorescence 20X. Subgroups: **A** E21. **B** Cc21. **C** Cs21. **D** E42. **E** Cc42. **F** Cs42. **G** E63. **H** Cc63. **I** Cs63. Scale = 100 $\mu$ m.

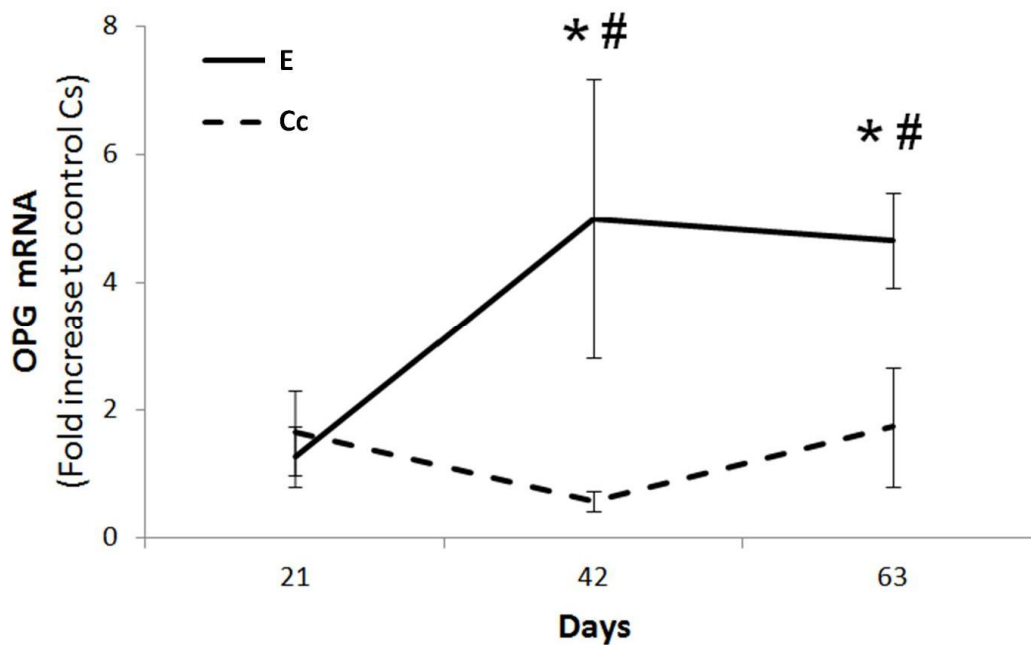




**Figure 7** Decalcified sections illustrating morphological characteristics of the teeth resorption for control and experimental groups. **P** Pulp; **D** Dentin; **C** Cementum; **PL** Periodontal Ligament; **B** Bone.  $\alpha V\beta 3$  Fluorescence 20X. Subgroups: **A** E21. **B** Cc21. **C** Cs21. **D** E42. **E** Cc42. **F** Cs42. **G** E63. **H** Cc63. **I** Cs63. Scale = 100 $\mu$ m.



**Figure 8** Genic expression of osteopontin.  $p < .05\%$  \* p vs Cs # p vs Cc



**Figure 9** Genic expression of osteoprotegerin.  $p < .05\%$  \* p vs Cs # p vs Cc

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho objetivou investigar as alterações na expressão de moléculas pró-inflamatórias associadas aos sítios de absorção radicular causada por repetidos ciclos de movimentação dentária induzida. Muitas das moléculas envolvidas no processo de absorção radicular também participam da reabsorção óssea, no entanto, a perda de parte da raiz não é desejada, enquanto a remodelação óssea se faz necessária para que ocorra o deslocamento do dente.

Sabe-se que a absorção radicular ocorre a partir de uma combinação de fatores locais e sistêmicos e as porções radiculares adjacentes às áreas de pressão são as diretamente acometidas pela perda de estrutura. Já foi demonstrado, esquematicamente, que as áreas radiculares expostas à pressão em movimentos dentários induzidos em ratos seriam diferentes daquelas esperadas com a utilização de aparatologia ortodôntica padrão em humanos devido à ausência de bráquetes, que garantem o binário necessário para a ocorrência da translação dentária. (Consolaro, 2005) Com isso, o movimento mesial em ratos é acompanhado de um permanente momento (rotação) do elemento dentário com tendência ao seu avulsionamento.

A partir desse contexto, o que poderia ser esperado com os achados da presente pesquisa realizada em ratos *Wistar*, devido aos centros de rotação de seus dentes localizarem-se próximos à área de furca, seria a divisão das faces

mesial e distal de suas raízes em duas metades distintas, sendo a metade cervical da face mesial acometida por pressão e a metade apical acometida por tensão, e o inverso ocorrendo na face distal da raiz. No entanto, tais alterações não foram constatadas, observando-se em todas as peças analisadas, nas quais induziu-se movimentação dentária, que a área acometida por absorção radicular foi preferencialmente o terço apical da face mesial, o que pode indicar uma concentração de força não condizente com área de tensão. Além disso, não foram observadas áreas de absorção radicular nas faces distais.

Diante dos resultados obtidos neste estudo experimental, as lacunas de absorção radicular encontraram-se concentradas na face mesial das raízes dos primeiros molares superiores, junto aos terços apical e médio, tendo sido observadas em todos os dentes do grupo experimental aos 21, 42 e 63 dias de movimentação ortodôntica.

Em humanos, a absorção radicular é mais comumente evidenciada no terço apical dos dentes submetidos ao movimento ortodôntico. Em estudos experimentais conduzidos em ratos, alguns autores observaram haver diferença no padrão de absorção radicular e sugeriram que as regiões mais acometidas seriam os terços cervical e médio. (Ren, Maltha *et al.*, 2004; Consolaro, 2005; Fernandes, 2008) No entanto, em nosso estudo, a coloração pela técnica de hematoxilina-eosina dos cortes histológicos permitiu a constatação de processo absorvitivo, sobretudo no terço apical das faces mesiais das raízes analisadas.

Os fenômenos absorvitivos foram progressivos ao longo de todo o experimento, aos 21, 42 e 63 dias, com a presença de clastos nas lacunas de absorção nas faces mesiais (Figura 3A, D e G) e de tecido cementóide de reparo, bastante evidente aos 63 dias (Figura 3G). Em outro trabalho científico do nosso

grupo de pesquisa, utilizando-se metodologia semelhante com apenas um ciclo de movimentação dentária, a análise histológica do periodonto mostra que, já nos primeiros dias após a ativação da mola (dia 3 e dia 7), o quadro inflamatório agudo se manifestou claramente com aumento na expressão dos marcadores, com alta atividade de TRAP, que permaneceu até o 14º dia da observação. (Fernandes, 2008)

A análise morfológica dos cortes histológicos dos animais dos subgrupos E21, E42 e E63 foi complementada, nesta pesquisa, com a utilização de técnicas de marcação específicas que corroboraram com as observações constatadas em HE, dentre elas a marcação para fosfatase ácida resistente a tartarato, que é característica da atividade clástica. (Tsuboi, Matsui *et al.*, 2003) Não foi observada marcação para TRAP nos animais dos subgrupos controles com e sem mola (Figura 4B, C, E, F, H e I) ou foi vista apenas no osso alveolar, o que é compatível com o processo fisiológico de remodelação óssea, onde há a presença de osteoclastos nos espaços ósseos medulares. (Yam e Janckila, 2003; Filgueira, 2004; Fernandes, 2008)

Em contraste, nos subgrupos experimentais, houve marcação positiva para TRAP ao longo de todo o tempo experimental (E21, E42 e E63) nas lacunas de absorção radicular, bem como no ligamento periodontal e na superfície óssea adjacentes (Figura 4A, D e G). Estes dados indicam a ocorrência de atividade clástica e remodelamento decorrente da aplicação da força ortodôntica no osso alveolar e no ligamento periodontal, assim como absorção ativa junto à superfície radicular. Mesmo após findado cada ciclo de ativação da aparatologia ortodôntica e movimentação dentária (21, 42 e 63 dias), a atividade clástica permaneceu,

provavelmente, contribuindo para o processo de resolução da zona de hialinização e início do processo de reparo tecidual. (Brudvik e Rygh, 1994; 1995)

A força de 50 cN empregada para ativação da mola está de acordo com o preconizado pela literatura em tempos experimentais de até 21 dias. (Consolaro, 2005; Fernandes, 2008) No entanto, não existem estudos realizados em ratos com o tempo experimental superior a 21 dias. Assim, nossos achados são inéditos envolvendo o modelo de movimentação dentária com vários ciclos de ativação da aparatologia ortodôntica por tempo prolongado. Contudo, o novo modelo experimental requer estudos mais aprofundados, uma vez que, em roedores os incisivos se caracterizam por terem crescimento contínuo. Embora, essa característica favoreça a dissipação da força inicial, isso pode não se repetir na reativação, que acarretaria na falta de tempo para reparo, ou ainda, em uso de força excessiva.

Os macrófagos são populações heterogêneas de células e podem ser residentes ou exsudativos. Ao passo que os macrófagos exsudativos migram para os sítios inflamatórios mediados por citocinas, os macrófagos residentes são onipresentes no corpo em condições normais de saúde. (Iwasaki, Otsuka *et al.*, 2011)

Nos tecidos, a presença de macrófagos pode ser detectada através da análise imunohistoquímica de marcadores como o F4/80, cuja expressão encontra-se aumentada em macrófagos residentes. (Leenen, De Bruijn *et al.*, 1994; Chan, Leenen *et al.*, 1998; Van Den Berg e Kraal, 2005; Lloyd, Phillips *et al.*, 2008; Vassiliou, Lolis *et al.*, 2010)

O aumento da expressão gênica de F4/80 ao longo de todo o experimento indica que um processo inflamatório está presente no local, em resposta à

deformação mecânica do ligamento periodontal gerada pela movimentação dentária. Embora aos 42 dias (E42) tenha ocorrido uma queda na expressão de F4/80 em relação a E21 e E63, esses valores não são estatisticamente diferentes e são maiores que os dos animais controle (Cs e Cc). Essa diferença observada no 42º dia tanto pode ser uma variação de animal para animal ou mesmo, uma alteração real na densidade da população de leucócitos no microambiente local, em função do desenvolvimento de uma resposta inflamatória persistente e/ou, também, de uma resposta de reparo tecidual.

A OPN desempenha um papel fisiológico importante nas regiões calcificadas por ser rica em ácido aspártico, fundamental na sua ligação com o cálcio.(Konya, Umekawa *et al.*, 2003) A OPN contém a sequência glicina-arginina-ácido aspártico que, ao ser reconhecida pela integrina  $\alpha\beta 3$  expressa pelos osteoclastos, modula a adesão celular. Desta forma, a OPN exerce papel expressivo na promoção e regulação da adesão e espalhamento dos clastos pela superfície mineralizada durante a absorção.(Denhardt, Noda *et al.*, 2001)

A OPN é expressa por osteoclastos, odontoclastos, osteócitos, cementócitos, osteoblastos, odontoblastos e macrófagos.(Terai, Takano-Yamamoto *et al.*, 1999; Morinobu, Ishijima *et al.*, 2003; Kuroda, Balam *et al.*, 2005; Fernandes, 2008) Logo, os osteócitos e os cementócitos exercem efeito quimiotático no recrutamento dos clastos.

Verificou-se a expressão de OPN mais intensa junto às superfícies dentária e óssea sobretudo no subgrupo E21, além de ter sido expressa também nos outros subgrupos do grupo experimental (E42 e E63), tendo sido marcado, também, o ligamento periodontal. Nos grupos controles, observou-se marcação basal de OPN, o que se justifica por ser componente da matriz extracelular do

tecido ósseo, cemento e dentina, participando da remodelação óssea, dentinogênese e cementogênese.(Bronckers, Farach-Carson *et al.*, 1994; Takano-Yamamoto, Takemura *et al.*, 1994; Bosshardt, Zalzal *et al.*, 1998; Nanci, 1999)

Um estudo prévio mostrou que a fosfatase da enzima TRAP está intimamente relacionada com a bioatividade da OPN pela desfosforilação.(Andersson, Ek-Rylander *et al.*, 2003) A OPN seria uma proteína multifuncional agindo na reabsorção e neoformação ósseas, bem como na absorção dentária, sob estresse mecânico.(Denhardt, Noda *et al.*, 2001)

Terai e colaboradores (1999) observaram que algumas células positivas para TRAP não o eram para OPN, concluindo que os clastos são positivos para OPN apenas quando em contato com o osso.(Terai, Takano-Yamamoto *et al.*, 1999; Kuroda, Balam *et al.*, 2005). O mesmo fato foi observado por Kuroda e colaboradores (2005) em relação ao contato do clasto com a superfície dentária e a expressão de OPN.(Kuroda, Balam *et al.*, 2005) Estes dados relacionam fortemente a expressão de OPN com a atividade absorvitiva dos clastos.

A expressão gênica de OPN corroborou os achados da imunofluorescência no estudo aqui discutido. Houve um pico de aumento expressivo aos 21 dias (E21), decrescendo a valores próximos aos seus respectivos controles (Cc21, Cc42, Cc63, Cs21, Cs42 e Cs63) nos demais subgrupos do grupo experimental (E42 e E63).

Os clastos usam a integrina  $\alpha\beta 3$  para interagirem com a OPN e se ligarem à matriz do tecido mineralizado. Estudo anterior encontrado na literatura mostrou que a ausência da mesma não impede a proliferação dos clastos, mas inviabiliza-os funcionalmente. (Matsuo e Irie, 2008) A imunofluorescência para a integrina  $\alpha\beta 3$  apresentou o mesmo padrão de marcação observado em relação à



osteopontina, corroborando com os dados da literatura que indicam uma interação entre ambas no processo de adesão celular à superfície mineralizada.(Macneil, Berry, D'errico, Strayhorn, Piotrowski *et al.*, 1995; Macneil, Berry, D'errico, Strayhorn e Somerman, 1995; Nakamura, Duong Le *et al.*, 2007; Fernandes, 2008)

O osteoblasto expressa RANKL que se liga ao RANK (seu receptor) na superfície do clasto. Isso permite a diferenciação dos precursores em osteoclastos multinucleados, a ativação e sobrevivência dos mesmos. A osteoprotegerina (OPG) é secretada por osteoblastos e células progenitoras e protege o esqueleto da reabsorção óssea excessiva ao se ligar ao RANKL e prevenir que ele interaja com o RANK. A OPG impede a ativação do osteoclasto maduro de forma reversível. Isso é conhecido como sistema RANKL/RANK/OPG. A proporção RANKL/OPG é um fator determinante da massa óssea e da integridade esquelética. (Feige, 2001; Boyce e Xing, 2007)

Devido aos resultados mostrando a intensa atividade osteoclástica nas lacunas de absorção radicular, foram feitos ensaios para análise da expressão gênica de osteoprotegerina. Corroborando os resultados anteriores, após o primeiro ciclo (E21), a expressão gênica de OPG exibiu valores baixos, semelhantes aos controles, aumentando significativamente após 42 dias (E42) e 63 dias (E63) de movimentação dentária, o que seria condizente com a manutenção de equilíbrio do sistema RANKL/RANK/OPG.

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com os propósitos da pesquisa e os resultados obtidos, pode-se concluir que:

6.1 A movimentação dentária induzida em primeiros molares superiores de ratos *Wistar*, a partir da aplicação de repetidos ciclos de força ortodôntica, manteve a resposta pró-inflamatória ao longo de todo o tempo experimental. Ocorreu o aumento da expressão de proteínas relacionadas à osteoclastogênese e reabsorção, acarretando no acúmulo de macrófagos e clastos nas áreas de compressão. Houve acréscimo da extensão das áreas de absorção radicular ao longo do experimento, sobretudo no terço apical.

6.2 A expressão gênica de F4/80, OPN e OPG corroborou os achados histológicos, destacando a grande sinalização de OPN aos 21 dias e o aumento tardio da OPG para equilibrar a atividade clástica. Todas as proteínas analisadas apresentaram íntima relação com o processo de absorção e reparo radicular decorrentes da movimentação dentária induzida.

## 7 RECOMENDAÇÕES

O presente trabalho demonstrou a expressão de TRAP, OPN, integrina  $\alpha\beta3$ , F4/80 e OPG no tempo experimental inédito de 63 dias e 3 ativações de aparatologia ortodôntica. Diante disso, verifica-se a necessidade de ampliação da investigação. A fim de promover o enriquecimento dos dados obtidos, sugere-se:

- a utilização de forças diferentes de 50cN, preferencialmente, menores;
- a investigação de outras proteínas, como forma de complementação das informações;
- a remoção da força, após 63 dias, para mapeamento do processo de reparo, e
- a avaliação de proteínas do fluido crevicular de pacientes em tratamento ortodôntico.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acar, A., U. Canyurek, *et al.* Continuous vs. discontinuous force application and root resorption. Angle Orthod, v.69, n.2, Apr, p.159-63; discussion 163-4. 1999.

Al-Qawasmi, R. A., J. K. Hartsfield, Jr., *et al.* Genetic predisposition to external apical root resorption. Am J Orthod Dentofacial Orthop, v.123, n.3, Mar, p.242-52. 2003.

\_\_\_\_\_. Root resorption associated with orthodontic force in inbred mice: genetic contributions. Eur J Orthod, v.28, n.1, Feb, p.13-9. 2006.

Andersson, G., B. Ek-Rylander, *et al.* TRACP as an osteopontin phosphatase. J Bone Miner Res, v.18, n.10, Oct, p.1912-5. 2003.

Baker, H. J., J. R. Lindsey, *et al.* The Laboratory Rat. San Diego: Academic Press Inc. 1979. 435 p.

Bhaskar, S. N. Histologia e Embriologia Oral de Orban. São Paulo: Editora Artes Médicas. 1989. 501 p.

Blair, H. C. e M. Zaidi. Osteoclastic differentiation and function regulated by old and new pathways. Rev Endocr Metab Disord, v.7, n.1-2, Jun, p.23-32. 2006.

Bosshardt, D. D. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? J Dent Res, v.84, n.5, May, p.390-406. 2005.

Bosshardt, D. D., S. Zalzal, *et al.* Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum. Anat Rec, v.250, n.1, Jan, p.13-33. 1998.

Boyce, B. F. e L. Xing. The RANKL/RANK/OPG pathway. Curr Osteoporos Rep, v.5, n.3, Sep, p.98-104. 2007.

Boyle, W. J., W. S. Simonet, *et al.* Osteoclast differentiation and activation. Nature, v.423, n.6937, May 15, p.337-42. 2003.

Brezniak, N. e A. Wasserstein. Root resorption after orthodontic treatment: Part 1. Literature review. Am J Orthod Dentofacial Orthop, v.103, n.1, Jan, p.62-6. 1993a.

\_\_\_\_\_. Root resorption after orthodontic treatment: Part 2. Literature review. Am J Orthod Dentofacial Orthop, v.103, n.2, Feb, p.138-46. 1993b.

\_\_\_\_\_. Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part I: The basic science aspects. Angle Orthod, v.72, n.2, Apr, p.175-9. 2002a.

\_\_\_\_\_. Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part II: The clinical aspects. Angle Orthod, v.72, n.2, Apr, p.180-4. 2002b.

Bronckers, A. L., M. C. Farach-Carson, *et al.* Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin, and dentin sialoprotein during dental root formation and early cementogenesis in the rat. J Bone Miner Res, v.9, n.6, Jun, p.833-41. 1994.

Brudvik, P. e P. Rygh. The initial phase of orthodontic root resorption incident to local compression of the periodontal ligament. Eur J Orthod, v.15, n.4, Aug, p.249-63. 1993.

\_\_\_\_\_. Multi-nucleated cells remove the main hyalinized tissue and start resorption of adjacent root surfaces. Eur J Orthod, v.16, n.4, Aug, p.265-73. 1994.

\_\_\_\_\_. Transition and determinants of orthodontic root resorption-repair sequence. Eur J Orthod, v.17, n.3, Jun, p.177-88. 1995.

Brudvik, P. R., P; Farrell, L ; Yen, E. Orthodontic root resorption: resorptive cell activity demonstrated by TRAP stain. J Dent Res, v.72, p.756. 1992.

Butler, W. T. Dentin matrix proteins. Eur J Oral Sci, v.106 Suppl 1, Jan, p.204-10. 1998.

Butler, W. T., J. C. Brunn, *et al.* Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis. Connect Tissue Res, v.44 Suppl 1, p.171-8. 2003.

Carpol, H. A qualitative roentgenographic evaluation of root length in hypothyroid patients. Am. J. Orthod, v.47, n.8, p.586-595. 1961.

Chan, J., P. J. Leenen, *et al.* Macrophage lineage cells in inflammation: characterization by colony-stimulating factor-1 (CSF-1) receptor (c-Fms), ER-MP58, and ER-MP20 (Ly-6C) expression. Blood, v.92, n.4, Aug 15, p.1423-31. 1998.

Christoffersen, J. e W. J. Landis. A contribution with review to the description of mineralization of bone and other calcified tissues in vivo. Anat Rec, v.230, n.4, Aug, p.435-50. 1991.

Chung, C. J., K. Soma, *et al.* OPN deficiency suppresses appearance of odontoclastic cells and resorption of the tooth root induced by experimental force application. J Cell Physiol, v.214, n.3, Mar, p.614-20. 2008.

Cole, A. A. e L. M. Walters. Tartrate-resistant acid phosphatase in bone and cartilage following decalcification and cold-embedding in plastic. J Histochem Cytochem, v.35, n.2, Feb, p.203-6. 1987.

- Consolaro, A. Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. Maringá: Dental Press Editora. 2005. 616 p.
- Counts, A. L. e R. A. Widlak. Generalized idiopathic external root resorption. J Clin Orthod, v.27, n.9, Sep, p.511-3. 1993.
- D'errico, J. A., R. L. Macneil, *et al.* Expression of bone associated markers by tooth root lining cells, in situ and in vitro. Bone, v.20, n.2, Feb, p.117-26. 1997.
- Denhardt, D. T. e X. Guo. Osteopontin: a protein with diverse functions. FASEB J, v.7, n.15, Dec, p.1475-82. 1993.
- Denhardt, D. T., M. Noda, *et al.* Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. J Clin Invest, v.107, n.9, May, p.1055-61. 2001.
- Dolce, C., A. Vakani, *et al.* Effects of echistatin and an RGD peptide on orthodontic tooth movement. J Dent Res, v.82, n.9, Sep, p.682-6. 2003.
- Duong, L. T., P. Lakkakorpi, *et al.* Integrins and signaling in osteoclast function. Matrix Biol, v.19, n.2, May, p.97-105. 2000.
- Feige, U. Osteoprotegerin. Ann Rheum Dis, v.60 Suppl 3, Nov, p.iii81-4. 2001.
- Fernandes, L. B. D. Expressão de Osteopontina e Integrina  $\alpha V\beta 3$  no Processo de Absorção Radicular Induzido por Movimentação Ortodôntica. Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008. 51 p.
- Filgueira, L. Fluorescence-based staining for tartrate-resistant acidic phosphatase (TRAP) in osteoclasts combined with other fluorescent dyes and protocols. J Histochem Cytochem, v.52, n.3, Mar, p.411-4. 2004.
- Fisher, J. E., M. P. Caulfield, *et al.* Inhibition of osteoclastic bone resorption in vivo by echistatin, an "arginyl-glycyl-aspartyl" (RGD)-containing protein. Endocrinology, v.132, n.3, Mar, p.1411-3. 1993.
- Fisher, L. W., D. A. Torchia, *et al.* Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. Biochem Biophys Res Commun, v.280, n.2, Jan 19, p.460-5. 2001.
- Flores, M. E., M. Norgard, *et al.* RGD-directed attachment of isolated rat osteoclasts to osteopontin, bone sialoprotein, and fibronectin. Exp Cell Res, v.201, n.2, Aug, p.526-30. 1992.
- Fujikawa, Y., A. Sabokbar, *et al.* The effect of macrophage-colony stimulating factor and other humoral factors (interleukin-1, -3, -6, and -11, tumor necrosis factor-alpha, and granulocyte macrophage-colony stimulating factor) on human osteoclast formation from circulating cells. Bone, v.28, n.3, Mar, p.261-7. 2001.

- Furquim, L. Z. Perfil endocrinológico de pacientes ortodônticos com e sem reabsorções dentárias: correlação com a morfologia radicular e da crista óssea alveolar. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru., 2002. 122 p.
- Giancotti, F. G. A structural view of integrin activation and signaling. Dev Cell, v.4, n.2, Feb, p.149-51. 2003.
- Griffith, J. Q. e E. J. Farris. The rat in laboratory investigation. Philadelphia: J. B. Lippincott Company. 1942. 488 p.
- Hammarstrom, L. e S. Lindskog. General morphological aspects of resorption of teeth and alveolar bone. Int Endod J, v.18, n.2, Apr, p.93-108. 1985.
- Harkness, J. E. e J. E. Wagner. Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores. São Paulo: Livraria Roca Ltda. 1993. 238 p.
- Hayman, A. R. e T. M. Cox. Tartrate-resistant acid phosphatase knockout mice. J Bone Miner Res, v.18, n.10, Oct, p.1905-7. 2003.
- Holliday, L. S., H. G. Welgus, *et al.* Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. J Biol Chem, v.272, n.35, Aug 29, p.22053-8. 1997.
- Iwasaki, Y., H. Otsuka, *et al.* In situ proliferation and differentiation of macrophages in dental pulp. Cell Tissue Res, v.346, n.1, Oct, p.99-109. 2011.
- Izquierdo, A. M., F. D. Mishima, *et al.* Effects of induced precocious puberty on cranial growth in female Wistar rats. Eur J Orthod, v.34, n.2, p.133-40. 2012.
- Kamada, K. M. P., R., Et Al. Dimensions and dynamics in integrin function. . Braz J Med Biol Res, v.36, p.959-966. 2003.
- Katsumi, A., A. W. Orr, *et al.* Integrins in mechanotransduction. J Biol Chem, v.279, n.13, Mar 26, p.12001-4. 2004.
- Konya, E., T. Umekawa, *et al.* The role of osteopontin on calcium oxalate crystal formation. Eur Urol, v.43, n.5, May, p.564-71. 2003.
- Kuroda, S., T. A. Balam, *et al.* Expression of osteopontin mRNA in odontoclasts revealed by in situ hybridization during experimental tooth movement in mice. J Bone Miner Metab, v.23, n.2, p.110-3. 2005.
- Leenen, P. J., M. F. De Bruijn, *et al.* Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. J Immunol Methods, v.174, n.1-2, Sep 14, p.5-19. 1994.
- Lindskog, S., L. Blomlof, *et al.* Cellular colonization of denuded root surfaces in vivo: cell morphology in dentin resorption and cementum repair. J Clin Periodontol, v.14, n.7, Aug, p.390-5. 1987.

Lloyd, C. M., A. R. Phillips, *et al.* Three-colour fluorescence immunohistochemistry reveals the diversity of cells staining for macrophage markers in murine spleen and liver. J Immunol Methods, v.334, n.1-2, May 20, p.70-81. 2008.

Luckashenak, N. e J. L. Clements. Signaling mechanisms utilized by antigen receptors and integrins: common intermediates, different outcomes? Front Biosci, v.12, p.419-36. 2007.

Macneil, R. L., J. Berry, *et al.* Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis. Connect Tissue Res, v.33, n.1-3, p.1-7. 1995.

\_\_\_\_\_. Localization and expression of osteopontin in mineralized and nonmineralized tissues of the periodontium. Ann N Y Acad Sci, v.760, Apr 21, p.166-76. 1995.

\_\_\_\_\_. Expression of bone sialoprotein mRNA by cells lining the mouse tooth root during cementogenesis. Arch Oral Biol, v.41, n.8-9, Aug-Sep, p.827-35. 1996.

Matsuo, K. e N. Irie. Osteoclast-osteoblast communication. Arch Biochem Biophys, v.473, n.2, May 15, p.201-9. 2008.

Mezadri, T. J., V. A. Tomáz, *et al.* Animais de Laboratório. Cuidados na Experimentação Animal. Florianópolis: Editora da UFSC. 2004. 155 p.

Minkin, C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. Calcif Tissue Int, v.34, n.3, May, p.285-90. 1982.

Miyauchi, A., J. Alvarez, *et al.* Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. J Biol Chem, v.266, n.30, Oct 25, p.20369-74. 1991.

Morinobu, M., M. Ishijima, *et al.* Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo. J Bone Miner Res, v.18, n.9, Sep, p.1706-15. 2003.

Morita, H., H. Yamashiya, *et al.* The collagenolytic activity during root resorption of bovine deciduous tooth. Arch Oral Biol, v.15, n.6, Jun, p.503-8. 1970.

Nakamura, I., T. Duong Le, *et al.* Involvement of alpha(v)beta3 integrins in osteoclast function. J Bone Miner Metab, v.25, n.6, p.337-44. 2007.

Nanci, A. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. J Struct Biol, v.126, n.3, Jun 30, p.256-69. 1999.

Newman, W. G. Possible etiologic factors in external root resorption. Am J Orthod, v.67, n.5, May, p.522-39. 1975.

Pizzo, G., M. E. Licata, *et al.* Root resorption and orthodontic treatment. Review of the literature. Minerva Stomatol, v.56, n.1-2, Jan-Feb, p.31-44. 2007.



- Qin, J., O. Vinogradova, *et al.* Integrin bidirectional signaling: a molecular view. PLoS Biol, v.2, n.6, Jun, p.e169. 2004.
- Reitan, K. Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. Am J Orthod, v.53, n.10, Oct, p.721-45. 1967.
- \_\_\_\_\_. Initial tissue behavior during apical root resorption. Angle Orthod, v.44, n.1, Jan, p.68-82. 1974.
- Ren, Y., J. C. Maltha, *et al.* The rat as a model for orthodontic tooth movement--a critical review and a proposed solution. Eur J Orthod, v.26, n.5, Oct, p.483-90. 2004.
- Robey, P. G. Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function. Connect Tissue Res, v.35, n.1-4, p.131-6. 1996.
- Rodan, G. A. e T. J. Martin. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. Calcif Tissue Int, v.33, n.4, p.349-51. 1981.
- Rody, W. J., Jr., G. J. King, *et al.* Osteoclast recruitment to sites of compression in orthodontic tooth movement. Am J Orthod Dentofacial Orthop, v.120, n.5, Nov, p.477-89. 2001.
- Roodman, G. D. Cell biology of the osteoclast. Exp Hematol, v.27, n.8, Aug, p.1229-41. 1999.
- Rygh, P. Orthodontic root resorption studied by electron microscopy. Angle Orthod, v.47, n.1, Jan, p.1-16. 1977.
- Sameshima, G. T. e P. M. Sinclair. Predicting and preventing root resorption: Part I. Diagnostic factors. Am J Orthod Dentofacial Orthop, v.119, n.5, May, p.505-10. 2001a.
- \_\_\_\_\_. Predicting and preventing root resorption: Part II. Treatment factors. Am J Orthod Dentofacial Orthop, v.119, n.5, May, p.511-5. 2001b.
- Schwartz, M. A. Integrin signaling revisited. Trends Cell Biol, v.11, n.12, Dec, p.466-70. 2001.
- Sodek, J., B. Zhu, *et al.* Novel functions of the matricellular proteins osteopontin and osteonectin/SPARC. Connect Tissue Res, v.43, n.2-3, p.308-19. 2002.
- Takano-Yamamoto, T., T. Takemura, *et al.* Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin, and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. J Histochem Cytochem, v.42, n.7, Jul, p.885-96. 1994.
- Talic, N. F., C. Evans, *et al.* Inhibition of orthodontically induced root resorption with echistatin, an RGD-containing peptide. Am J Orthod Dentofacial Orthop, v.129, n.2, Feb, p.252-60. 2006.

Tanaka, O. M. Estudo dos efeitos da aplicação de hormônio de crescimento em ratos "Wistar". Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998. 150 p.

Terai, K., T. Takano-Yamamoto, *et al.* Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress. J Bone Miner Res, v.14, n.6, Jun, p.839-49. 1999.

Tsuboi, H., Y. Matsui, *et al.* Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage. Ann Rheum Dis, v.62, n.3, Mar, p.196-203. 2003.

Tsuji, Y., T. Yamaza, *et al.* Expression of cathepsin K mRNA and protein in odontoclasts after experimental tooth movement in the mouse maxilla by in situ hybridization and immunoelectron microscopy. Cell Tissue Res, v.303, n.3, Mar, p.359-69. 2001.

Van Den Berg, T. K. e G. Kraal. A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction. Trends Immunol, v.26, n.10, Oct, p.506-9. 2005.

Vassiliou, I., E. Lolis, *et al.* The combined effect of erythropoietin and granulocyte macrophage colony stimulating factor on liver regeneration after major hepatectomy in rats. World J Surg Oncol, v.8, p.57. 2010.

Walsh, N. C., M. Cahill, *et al.* Multiple tissue-specific promoters control expression of the murine tartrate-resistant acid phosphatase gene. Gene, v.307, Mar 27, p.111-23. 2003.

Yam, L. T. e A. J. Janckila. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP): a personal perspective. J Bone Miner Res, v.18, n.10, Oct, p.1894-6. 2003.

Yamamoto, M., J. E. Fisher, *et al.* The integrin ligand echistatin prevents bone loss in ovariectomized mice and rats. Endocrinology, v.139, n.3, Mar, p.1411-9. 1998.

## **9 ANEXO**

### **PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA**



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/003/2013 sobre "**Expressão de osteopontina e integrina  $\alpha V\beta 3$  no processo de absorção radicular induzido por sucessivos ciclos de movimentação ortodôntica**", sob a responsabilidade de **Thereza Christina Barja-Fidalgo**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **05/03/2013**. Este certificado expira em **05/03/2016**.

Rio de Janeiro, 05 de Março de 2013.

---

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa  
CEUA/IBRAG/UERJ

---

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb  
CEUA/IBRAG/UERJ

*Prof<sup>a</sup> Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva*  
*Prof<sup>a</sup> Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ*  
*l.ass* *Matricula 34765-8*