

UNIVERSIDADE DO BRASIL –UFRJ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

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

Luciana Boaventura Duarte Fernandes

CD

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

Rio de Janeiro

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

Luciana Boaventura Duarte Fernandes, C.D.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Mônica Tirre de Souza Araújo

Prof^a. Dr^a. Thereza Christina Barja-Fidalgo

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

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Margareth M.G. de Souza
CD

Prof^a. Dr^a. Matilde Gonçalves Nojima
CD

Prof^a. Dr^a. Patrícia M. R. e Silva Martins

Rio de Janeiro

2008

Ficha Catalográfica

BOAVENTURA, Luciana Duarte Fernandes

Expressão de osteopontina e integrina $\alpha\beta 3$ no processo de absorção radicular induzido por movimentação ortodôntica. Orientadores: **Mônica Tirre de Souza Araújo; Thereza Christina Barja-Fidalgo.** Rio de Janeiro:

UFRJ/Faculdade de Odontologia, 2008.

xv, 51 f.

Dissertação: Mestrado em Odontologia (Ortodontia) – Universidade do Brasil – UFRJ, Faculdade de Odontologia, 2008.

1. Movimento ortodôntico

2. Osteopontina

3. Integrina

4. Teses

I. Título

II. Dissertação (Mestrado - UFRJ/Faculdade de Odontologia)

DEDICO

A Deus, pela vida, por todos os dons e oportunidades recebidos.

Aos meus pais, Evandro e Lourdes pelo amor, dedicação, educação e exemplo presentes ontem, hoje e sempre.

A minha filha Catarina, pela inspiração, carinho e por me fazer querer ser melhor a cada dia.

Ao meu esposo José Luis, por todo amor, apoio, compreensão e companheirismo.

Aos meus irmãos, Cristiano, Mariza e Sérgio, pela amizade e estímulo.

AGRADECIMENTOS

Muitas foram as pessoas que contribuíram para a elaboração deste trabalho. Cada uma a sua forma colaborou para que este projeto se concretizasse. A todas elas muito obrigada!

Aos professores do Curso de Mestrado em Ortodontia da F.O.-UFRJ. Minha admiração e gratidão pelos ensinamentos de uma Ortodontia séria e fundamentada em bases científicas respeitadas. **Dr. Alderico Artese, Dra. Ana Maria Bolognese, Dr. Antônio Carlos de Oliveira Ruellas, Dr. Eduardo Franzotti Sant'Anna, Dr. José Fernando Stangler Brazzalle, Dr. Lincoln Issamu Nojima, Dra. Maria Evangelina Monnerat, Dra. Margareth Maria Gomes de Souza, Dra. Matilde da Cunha Gonçalves Nojima e Dra. Teresa Cristina Moreira.**

À professora **Dra. Mônica Tirre de Souza Araújo**, pela confiança, compreensão e fundamental ajuda na orientação deste trabalho.

À professora **Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo** do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Celular do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia do IBRAG-UERJ ,que acolheu e apoiou incondicionalmente o projeto. Obrigada pela co-orientação.

Ao professor **Jorge José de Carvalho** do Departamento de Histologia e Embriologia do IBRAG-UERJ, pelo auxílio na microscopia e pela disponibilização dos meios para o processamento e preparo das lâminas.

A **Ana Lúcia** do Departamento de Histologia do IBRAG-UERJ, pela convivência agradável, incansável auxílio no processamento das peças e ensinamentos em histologia.

A todos do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Celular (LFBC-UERJ), que sempre foram simpáticos, amigos e que muito me ensinaram.

A **Roberta Saldanha-Gama**, do LFBC, pela paciência nas intermináveis horas de bancada e imunofluorescência, entusiasmo, incentivo e disponibilidade em todas as etapas deste trabalho.

A **Simone Vargas e Heitor Affonso de Paula Neto**, do LFBC, pela inestimável ajuda no manuseio dos animais.

A **Christina Vilella e Amanda Lobo**, do LFBC, pelo precioso auxílio na realização do RT-PCR.

Aos professores **Dr. Paulo Sérgio de Assunção e Dra. Margareth Maria Gomes de Souza**, cujos exemplos profissionais incentivaram meus propósitos de ingresso neste curso.

Aos professores **Dr. Eurico Passos de Oliveira e Dr. Miguel Régio**, pelos ensinamentos no Estágio em Ortodontia na UFPel.

Aos professores das disciplinas conexas, em especial ao professor **Ronir Raggio Luiz** pelo auxílio com a análise estatística.

A “irmã” e colega de turma **Paula Paiva**, pela amizade, companheirismo e primordial ajuda na colocação das molas.

Ao amigo **Antonio Izquierdo**, pelo socorro nos momentos difíceis, ajuda na colocação das molas e sacrifício dos animais.

Aos colegas de turma, **Ângela Dalvi, Cristiane Machado, Matheus Pithon, Mauricio Guerra, Raphael Brito e Rogério Lacerda** pela oportunidade de aprendizado com o convívio diário.

Aos colegas da 41^a e 43^a turmas pela convivência e amizade.

Aos colegas do Doutorado, **Ana de Lourdes, Camilo, Hugo, José Columbano, José Vinicius, Sávio e Stella.**

Aos funcionários da Disciplina de Ortodontia, **Ana Cristina, Daniel, Mônica, Robson, Therezinha, Vanda, Vanilda e Waltencir** pelo auxílio constante, apoio e amizade.

A **Dental Morelli** pela doação das molas de níquel-titânio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior **CAPES**, pela bolsa de estudos concedida.

RESUMO

BOAVENTURA, Luciana D. F. **Expressão de osteopontina e integrina $\alpha\beta 3$ no processo de absorção radicular induzido por movimentação ortodôntica.**

Orientador: Dr^a. Mônica Tirre de Souza Araújo; Dr^a. Thereza Christina Barja-Fidalgo. Rio de Janeiro: UFRJ/ Faculdade de Odontologia, 2008.

Dissertação (Mestrado em Odontologia – Ortodontia). xv, 51 f.

Este estudo objetivou avaliar a atividade clástica e a expressão de osteopontina (OPN) e da integrina $\alpha\beta 3$ na superfície radicular adjacente às áreas de pressão dos dentes submetidos à movimentação ortodôntica em ratos. Utilizou-se 80 ratos Wistar machos, divididos em 4 grupos submetidos ao movimento ortodôntico (n= 56) e 1 grupo controle, sem movimentação dentária (n=24). Uma mola de níquel-titânio aplicou força de 50cN sobre o primeiro molar superior esquerdo, movendo-o em direção mesial. A análise dos parâmetros estudados foi realizada 3, 7, 14 e 21 dias após a colocação do dispositivo. Parte das peças destinou-se a análise da expressão de OPN 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 (TRAP). A análise histológica mostrou que houve aumento da atividade clástica, evidenciada pela presença de TRAP bem como detectou-se a expressão de OPN e integrina $\beta 3$, associadas a superfície radicular nos lados de pressão nos dias 3 e 7. As lacunas

de absorção no 14^o e 21^o dias exibiram sinais de reparo, com diminuição das marcações adjacentes à área radicular e maior sinalização (OPN, β 3 e TRAP) junto ao osso alveolar. A análise da expressão gênica de OPN corroborou os resultados histológicos, mostrando aumento do RNA-m para OPN nos dias iniciais do experimento (3 e 7), diminuição no 14^o dia e aproximando-se dos níveis controle no 21^o dia. Os resultados indicam que o aumento na expressão da integrina β 3 e da OPN está associado a atividade clástica nas lacunas de absorção radicular, que ocorrem no lado de pressão decorrentes da movimentação dentária induzida.

SUMMARY

BOAVENTURA, Luciana D.F. **Expressão de osteopontina e integrina $\alpha\beta 3$ no processo de absorção radicular induzido por movimentação ortodôntica.**

Orientador: Dr^a. Mônica Tirre de Souza Araújo; Dr^a. Thereza Christina Barja-Fidalgo. Rio de Janeiro: UFRJ/ Faculdade de Odontologia, 2008.

Dissertação (Mestrado em Odontologia – Ortodontia). xv, 51 f.

The aim of this study was to analyse the activity of odontoclasts and the expression of osteopontin (OPN) and $\alpha\beta 3$ integrin in tooth root surface during orthodontic tooth movement in rats. Eighty male Wistar rats were used in this study, divided in four experimental groups submitted to orthodontic tooth movement (n= 56), and one control group, without orthodontic tooth movement (n=24). A Ni-Ti closed coil spring was tied in the upper left molar with a force of 50cN, moving the tooth into mesial direction. The animals were sacrificed after 3, 7, 14 and 21 days after device installation and the left hemi-maxilla were dissected for analysis. Part of that material was histological prepared for hematoxilin-eosin staining, immunofluorescence reaction for acid phosphatase (TRAP), to detect clastic activity, and also for OPN and $\beta 3$ integrin expression. The gene expression for OPN was assayed by RT-PCR in radicular tissue samples. An increase in clastic activity, which paralleled with an augmented expression of OPN and $\beta 3$ integrin, were observed on the side of the tooth root surface submitted to

orthodontic tooth movement, at days 3 and 7. On the days 14 and 21 after device installation, the resorption lacunae showed signs of repair, with decreased expression of TRAP, OPN and $\beta 3$ near tooth root surface, and increased signaling near alveolar bone surface. The analysis of the OPN gene expression, corroborated with the histological observation, showing a greater expression of OPN-mRNA in the initial days of experiment (3 and 7) decreasing on the 14th day and reaching control values on day 21. Taken together the data indicates that during the initial stage of orthodontic tooth movement occurs tooth root resorption in the pressure areas, characterized by an increase in the clastic activity, which correlates and co-localizes with the higher expression of OPN and its natural ligand, the $\beta 3$ integrin.

LISTA DE ABREVIATURAS

CAUAP	Comissão de Avaliação do uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
cN	centiNewton
cDNA	cadeia complementar de DNA
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
dATP	<i>Deoxyadenisine triphosphate</i>
dCTP	<i>Deoxycytidine triphosphate</i>
dGTP	<i>Deoxyguanosine triphosphate</i>
dTTP	<i>Thymidine triphosphate</i>
EDTA	<i>Ethilene-diamine-tetraacetic-acid</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
LiCl	cloreto de lítio
M	molar
MCSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
M-MLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
OPN	osteopontina
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PNC	proteínas não-colágenas

RANKL	<i>Receptor activator of NFκB ligand</i>
Rpm	rotações por minuto
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
TRAP	<i>Tartrate resistant acid phosphatase</i>
µg	micrograma
µm	micrômetro
UV	ultra-violeta

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO Página

Figura 1 Representação esquemática de célula clástica..... 4

DELINEAMENTO DA PESQUISA

Figura 1 Fotografias ilustrativas da sequência de instalação do dispositivo ortodôntico..... 13

ARTIGO

Figure 1 Morphological changes in radicular surface after experimental tooth movement..... 29

Figure 2 Fluorescent staining for TRAP showing acid phosphatase expression near radicular surface after experimental tooth movement..... 30

Figure 3 Immunofluorescence showing OPN staining near radicular surface after experimental orthodontic tooth movement..... 31

Figure 4 Graphs representing the densitometry values for OPN gene expression..... 28

Figure 5	Immunofluorescence showing β_3 staining near radicular surface after experimental orthodontic tooth movement...	32
----------	---	----

DISCUSSÃO

Figura 1	Marcação por imunohistoquímica para integrina β_3 em face ativa de clasto.....	42
----------	--	----

ÍNDICE

	<i>Página</i>
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 PROPOSIÇÃO.....	9
3 DELINEAMENTO DA PESQUISA	10
4 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA	19
4.1 ARTIGO: BOAVENTURA, L. D. F; CARVALHO, J. J.; BARJA-FIDALGO, T .C.; TIRRE-ARAUJO, M. S. Expression of osteopontin and $\alpha\beta 3$ integrin in root resorption induced by experimental orthodontic force application. Artigo a ser submetido ao Journal of Dental Research	20
5 DISCUSSÃO.....	38
6 CONCLUSÃO.....	43
7 RECOMENDAÇÕES	44
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

O osso renova-se constantemente através da remodelação óssea, um processo caracterizado pela alternância dos fenômenos fisiológicos de absorção e neoformação. No entanto, a absorção dos tecidos mineralizados dos dentes permanentes é considerada patológica, uma vez que não há, ao contrário do tecido ósseo, contribuição do processo de absorção na manutenção estrutural ou funcional do órgão dentário. (BHASKAR, 1989).

Absorção radicular é a perda parcial de cimento e dentina radicular do dente (PIZZO, LICATA, GUIGLIA, *et al.*, 2007) e é um dos problemas iatrogênicos mais freqüentes na movimentação dentária ortodôntica (BREZNIAK AND WASSERSTEIN, 2002a, 2002b). A relação entre absorção radicular e tratamento ortodôntico foi descrita pela primeira vez em 1914 (OTTOLENGUI). A região apical é a mais afetada, havendo diminuição do comprimento dentário e redução do suporte periodontal do dente. (REITAN, 1974).

As absorções radiculares apresentam variada etiopatogenia, envolvendo a combinação de aspectos genéticos, ambientais, bioquímicos, morfológicos, sistêmicos e mecânicos (PHILLIPS, 1955; RYGH, 1977; BREZNIAK & WASSERSTEIN, 1993; ACAR, 1999; AL-QAWASMI, 2003; CONSOLARO *et al.*, 2004). 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 *et al.*, 2003; Al-QAWASMI, 2005) até estudos onde não foi encontrada qualquer correlação. (NEWMAN, 1975). Localmente, relaciona-se a ocorrência de absorções radiculares com a morfologia radicular (forma, comprimento e angulação entre coroa e raiz) e morfologia óssea (altura, espessura e forma da crista alveolar). Raízes afiladas, dilaceradas, curtas e anguladas em relação à coroa são mais predispostas à absorção, assim como cristas alveolares reduzidas em altura, espessas e de formato quadrangular, que propiciam maior concentração das forças ortodônticas por sofrerem menor deflexão óssea. (BREZNIAK & WASSERSTEIN, 1993; SAMESHIMA & SINCLAIR, 2001a; SAMESHIMA & SINCLAIR, 2001b; CONSOLARO, 2005). Sistemicamente alguns autores consideraram que endocrinopatias como hipotireoidismo, hiperpituitarismo e hiperparatireoidismo teriam significado etiológico preponderante nas absorções radiculares (CARPOL, 1961; COUNTS & WIDLAK, 1993). No entanto, outros trabalhos mostram que o desequilíbrio hormonal influenciaria, mas não causaria absorção radicular (NEWMAN, 1975; FURQUIM, 2002).

Histórico de traumatismos anteriores, tratamento endodôntico e absorções prévias aumentam o risco de absorções radiculares durante a movimentação ortodôntica. (SAMESHIMA & SINCLAIR, 2001b; CONSOLARO, 2005). Além disto, duração prolongada de tratamento, tipo de maloclusão ("overjet" acentuado), movimentos de torque, intrusão e extrusão, magnitude da força (elevada) e distância (longa) do movimento são fatores mecânicos que contribuem para a ocorrência de absorção radicular (PHILLIPS, 1955; SAMESHIMA & SINCLAIR, 2001a ; SAMESHIMA & SINCLAIR, 2001b; CONSOLARO, 2005).

Os tipos celulares participantes do mecanismo de absorção são os osteoblastos, osteoclastos e células mononucleares da linhagem dos macrófagos. A esse conjunto celular dá-se o nome de unidade de absorção de tecido mineralizado ou unidade osteorremodeladora. Em um estágio precursor, os pré-osteoclastos são encontrados na circulação periférica juntamente com a população celular monocítica. (SALHOUB *et al*, 2000). Através da circulação sanguínea, são recrutados para as superfícies internas ou externas do osso por todo o esqueleto onde o processo de reabsorção seja requerido. Os osteoclastos são ativados sob a influência de fatores de diferenciação e maturação, incluindo o fator de estimulação de colônia de macrófagos (MCSF) (FUJIKAWA *et al.*, 2001) e o ligante do receptor-ativador de NFκB (RANK-L) (FEIGE, 2001) liberados respectivamente por macrófagos e osteoblastos (HOLLIDAY *et al.*, 1997; RODY *et al.*, 2001). Estes últimos, por sua vez, têm sua atividade modulada por mediadores locais (citocinas, fatores de crescimento e prostaglandinas) e sistêmicos (paratormônio, vitamina D3, calcitonina, estrógenos) (RODAN & MARTIN, 1981). As células responsáveis pela absorção radicular são denominadas odontoclastos e são similares aos osteoclastos nos seus aspectos estruturais e funcionais (MORITA *et al.*, 1970; BRUDVIK & RYGH, 1993; TSUJI *et al.*, 2001; BREZNIAK & WASSERSTEIN, 2002; CONSOLARO, 2005). Na superfície do cemento situam-se ainda os cementoblastos, que não possuem receptores para os mediadores químicos da absorção, conferindo proteção à superfície radicular da ação dos clastos. (LINDSKOG *et al.*, 1987; CONSOLARO, 2005).

Osteoclastos são células multinucleadas de origem hematopoiética que absorvem o tecido mineralizado através da adesão à superfície óssea via uma

estrutura altamente especializada e polarizada. O processo de reabsorção óssea compreende a proliferação de células progenitoras dos osteoclastos; diferenciação dos progenitores em pré-osteoclastos mononucleares (pré-fusão); fusão dos pré-osteoclastos em osteoclastos multinucleares e migração dos osteoclastos para as lacunas de absorção. A adesão à superfície óssea se dá através da formação da “zona de selamento”, e os osteoclastos polarizam para criar uma borda em escova, sua face ativa, de forma enrugada, com prolongamentos citoplasmáticos especializados voltados para a lacuna de absorção (ROODMAN, 1999; BOYLE, SIMONET, LACEY, 2003).

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 cria um microambiente que permite a secreção direcionada de ácidos (TRAP) e enzimas lisossomais (catepsina K) nos espaços entre a borda em escova (Figura 1) (DENHARDT & GUO, 1993). A expressão conjunta destas substâncias é bem específica, sendo a fosfatase ácida resistente a tartrato (TRAP) considerada o principal marcador de atividade clástica. (MINKIN, 1982; COLE & WALTERS, 1987; BRUDVIK, RYGH, FARRELL, 1992; HAYMAN & COX, 2003; FILGUEIRA, 2004). No entanto, a TRAP pode ser expressa por outras células como macrófagos e células dendríticas sob certas condições. (TSUBOI, MATSUI, HAYASHIDA, *et al.*, 2003; WALSH, CAHILL, CARNINCI, *et al.*, 2003).

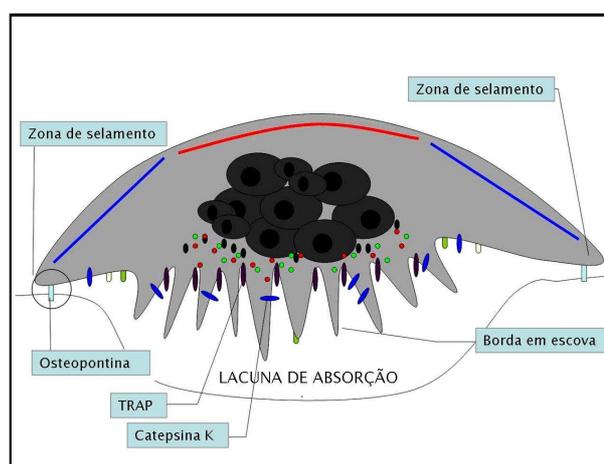


Figura 1 Representação esquemática de célula clástica.

Para organizar estas estruturas citoplasmáticas altamente polarizadas, os clastos devem migrar e aderir à superfície mineralizada. Desta forma, o reconhecimento dos componentes da matriz extracelular dos tecidos mineralizados pelos clastos é um passo importante na iniciação funcional destas células (DENHARDT & GUO, 1993; DOLCE *et al.*, 2003; BLAIR & ZAID, 2006; NAKAMURA *et al.*, 2007).

As matrizes do osso e cimento são compostos biológicos que consistem de água, minerais, macromoléculas colágenas e não-colágenas, estas últimas conhecidas como proteínas não-colágenas (PNC). Nos tecidos mineralizados o colágeno interage com diversas PNCs e compõem um arcabouço para a acomodação dos cristais minerais.(CHRISTOFFERSEN & LANDIS, 1991). No osso e cimento o colágeno é o principal componente da matriz extracelular, compreendendo 80-90% 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 *et al.*, 2001; SODEK *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 reside na combinação destas PNCs (BUTLER *et al.*, 2003; BOSSHARDT, 2005).

A osteopontina e a sialoproteína são as duas maiores PNCs do osso e cimento (BRONCKERS *et al.*, 1994; MACNEIL *et al.*, 1996; D'ERRICO *et al.*, 1997; BOSSHARDT *et al.*, 1998; NANCI, 1999).

A osteopontina (OPN) é a principal glicoproteína não-colágena da matriz extracelular óssea capaz de mediar a adesão celular através de receptores de membrana (integrinas) e está ligada a 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 *et al.*, 1999 ; LEE *et al.*, 2004; CHUNG *et al.*, 2007). Em trabalho recente, mostrou-se que camundongos deficientes em OPN quando submetidos a movimento dentário induzido sofreram diminuição na formação de odontoclastos, com conseqüente redução na absorção radicular, quando comparados ao tipo selvagem (CHUNG, SOMA, RITTLING *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, YAMAMOTO, OHBA *et al.*, 1999).

A adesão do clasto à superfície mineralizada se dá através de receptores glicoproteicos de superfície celular denominados integrinas. As integrinas mediam vários tipos de interações célula-célula e célula-matriz e são compostas por subunidades α e β que reconhecem uma ampla gama de ligantes celulares e de matriz extracelulares. A sinalização mediada pelas integrinas regula uma variedade de funções celulares incluindo desenvolvimento embrionário,

hemostasia, ativação de leucócitos, reabsorção óssea, resposta celular a estresse mecânico, crescimento tumoral e metástases (MIYAUCHI *et al*, 1991; DUONGU *et al*, 2000; SCHWARTZ, 2001; BOYLE, SIMONET & LACEY, 2003; GIANCOTTI, 2003; KAMADA, PANKOV *et al.*, 2003; KATSUMI & ORR, 2004; QIN, VINOGRADOVA *et al.*, 2004; LUCRASHENAR & CLEMENTS, 2007).

A integrina $\alpha_v\beta_3$ é o principal receptor de adesão presente na membrana celular clástica e interage com proteínas da matriz mineralizada, especialmente a osteopontina e a sialoproteína, através do reconhecimento da seqüência tripeptídica: Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD), presente nestas proteínas (FLORES *et al.* 1992; FISCHER *et al.* ,1993; YAMAMOTO *et al.* ,1998; WIERZBICKA-PATYNOWSKI, NIEWIAROWSKI *et al.*, 1999; TALIC *et al.*, 2006).

Segundo Andreasen (1985), a absorção radicular externa de superfície é a que geralmente está 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. Entretanto, na área de pressão da movimentação ortodôntica, a força aplicada sobre o dente pode comprimir os vasos do ligamento periodontal 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 & RYGH, 1993). As primeiras células envolvidas na remoção do tecido necrótico na periferia da zona de hialinização são negativas para fosfatase ácida resistente a tartrato (TRAP), não apresentam

borda em escova e assemelham-se a macrófagos, provavelmente ativadas por sinais provenientes do tecido com necrose estéril. A este grupo celular seguem-se 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 & RYGH, 1993; BRUDVIK & RYGH, 1994; BREZNIAK & WASSERSTEIN, 2002).

A união firme e estável do clasto à superfície mineralizada é denominada de anel ou zona de selamento. Quebrar bioquimicamente esta união com o uso de alguma substância pode ser uma forma de atuar terapêuticamente no controle e tratamento das absorções ósseas e dentárias (CONSOLARO, 2005).

A expressão do papel da integrina $\alpha_v\beta_3$ e da glicoproteína osteopontina na absorção óssea já foi descrito (FLORES *et al.*, 1992; FISCHER *et al.*, 1993; YAMAMOTO *et al.*, 1998; WIERZBICKA-PATYNOWSKI *et al.*, 1999; TALIC *et al.*, 2006). No entanto, faltam evidências sobre sua participação no processo de absorção radicular decorrente da movimentação ortodôntica (TERAI *et al.*, 1999; TALIC *et al.*, 2004; CHUNG *et al.*, 2008) 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 o aumento da ancoragem ortodôntica.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar a atividade clástica e a expressão de osteopontina e integrina $\alpha\beta 3$ na superfície radicular de primeiros molares superiores de ratos ,após a aplicação de força ortodôntica.

2.1 localizando e caracterizando histologicamente as lacunas de absorção

2.2 analisando a variação na expressão destas proteínas ao longo do tempo experimental

3 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Neste estudo foram utilizados 80 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com idade aproximada de 60 dias e peso médio de 300g. A escolha por ratos machos visou eliminar a variação hormonal associada ao estro nas fêmeas (DOLCE, 2003). Os animais foram mantidos em biotério com temperatura entre 18 e 26° Celsius (C), umidade relativa do ar entre 40 a 70 % e foto-período controlado (ciclo de 12 horas claro/ 12 horas escuro), com disponibilidade *ad libitum* de água e ração. Durante a realização da pesquisa, todos os procedimentos obedeceram às recomendações éticas e legais especificadas para experimentos em animais, aprovadas pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais (CAUAP) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro e pelo Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

A amostra constou de quatro grupos, divididos de acordo com o dia da eutanásia, sendo os animais distribuídos do seguinte modo: 24 pertencendo ao grupo **controle (C)** e 56 ao grupo **experimental (E)**.

GRUPO CONTROLE (C): constituído por 24 animais que não receberam o dispositivo ortodôntico, sendo apenas sedados, servindo de parâmetro para os demais. A eutanásia ocorreu nos 3º, 7º, 14º e 21º dias após a sedação, 6 animais em cada uma das datas relacionadas.

GRUPO EXPERIMENTAL (E): constituído por 56 animais que, após sedação, receberam o dispositivo ortodôntico no primeiro molar superior esquerdo. A eutanásia ocorreu nos mesmos períodos, 14 animais em cada uma das datas relacionadas.

GRUPOS		EUTANÁSIA	N ^o ANIMAIS
CONTROLE	C3	3 ^o dia	6
	C7	7 ^o dia	6
	C14	14 ^o dia	6
	C21	21 ^o dia	6
EXPERIMENTAL	E3	3 ^o dia	14
	E7	7 ^o dia	14
	E14	14 ^o dia	14
	E21	21 ^o dia	14

A instalação dos dispositivos ortodônticos foi realizada sob sedação com injeção intraperitoneal de Cloridrato de quetamina (1,33 ml/kg), associado à Xilazina (0,67 ml/kg), administrados com seringa de 1ml.

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 0,008", contornando-se o dente abaixo do ponto de contato e torcendo o fio em seguida.

Para fixar e evitar o deslocamento da mola construiu-se uma canaleta horizontal nos incisivos, na região mais cervical possível, com o auxílio de broca diamantada esférica (KG Sorensen[®] n.1012) em baixa rotação, com refrigeração a ar (Figura 1A, página 13).

A superfície dos incisivos foi então preparada com adesivo autocondicionante hidrofílico (Transbond Plus Self Etching Primer[®]) e polimerizada por 20 segundos. A mola foi distendida de forma a aplicar uma força de 50cN (aferida com dinamômetro), sendo fixada anteriormente com fio de amarrilho em torno da canaleta nos incisivos.

Após amarrar a mola, aplicou-se resina composta (Transbond XT Light Cure Resin[®]) contornando o fio sobre a canaleta nos incisivos e nova polimerização foi realizada por 60 segundos (Figura 1B, página 13). Os incisivos inferiores foram desgastados com disco de carborundum para preservar a integridade do dispositivo (Figura 1C, 1D, página 13). A fim de permitir a alimentação adequada dos animais e evitar o deslocamento do dispositivo, durante o período experimental a ração peletizada foi substituída por moída.

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 trituração para extração de RNA.

3.1 PROCEDIMENTOS DE PREPARO HISTOLÓGICO

O material coletado foi fixado em solução de paraformaldeído 10% com tampão cacodilato, pH 7.2, por um período de 24 horas. Em seguida procedeu-se a descalcificação das peças com EDTA a 10% pH 7.4 por 6 a 8 semanas. Determinou-se o término da descalcificação quando foi possível a penetração da peça com agulha fina.

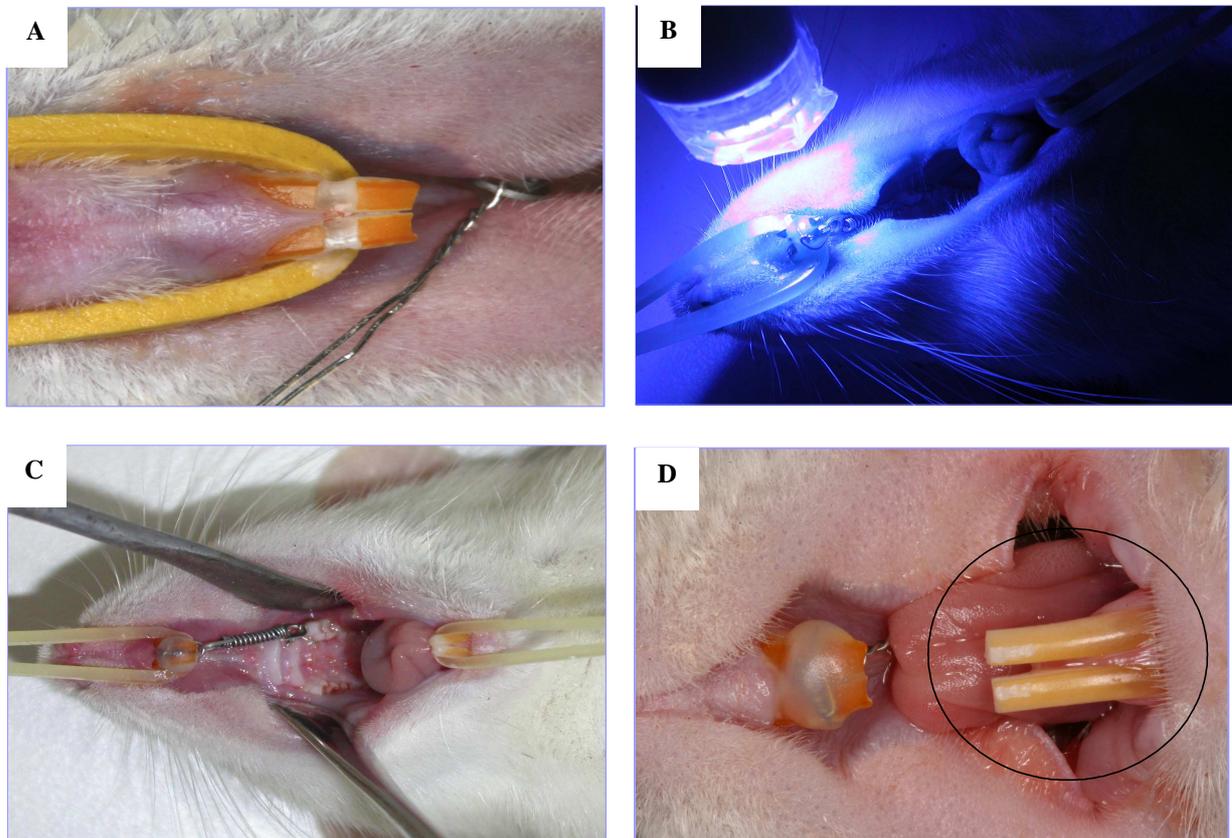


Figura 1 Fotografias ilustrativas da sequência de instalação do dispositivo ortodôntico. **A** canaletas horizontais nos incisivos para fixação do fio de amarrilho **B** polimerização da resina composta após adaptação da mola aos incisivos **C** dispositivo posicionado previamente ao corte dos incisivos inferiores **D** corte dos incisivos inferiores.

Após a descalcificação, o material foi inserido em cassetes plásticos individuais, lavado por 15 minutos em água corrente e desidratado em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes, permanecendo 60 minutos seqüencialmente em álcool 70% e 90%, seguido de dois banhos de 60 minutos em álcool 100%. Em seguida, o material foi diafanizado através de dois banhos em xilol, com duração de 30 minutos cada. O excesso de xilol foi removido com papel filtro e as peças colocadas em frascos contendo parafina líquida à temperatura de 60°C em estufa, durante 2 horas. Por fim, os espécimes foram removidos dos cassetes e posicionados em formas para inclusão em parafina, com intuito de obterem-se secções longitudinais das raízes dos primeiros molares superiores.

Os blocos de parafina foram levados ao micrótomo, onde realizaram-se cortes de 5 μm de espessura. As fitas obtidas dos blocos foram recolhidas em lâminas de vidro silazinadas, sendo colocadas duas em cada lâmina. As mesmas destinaram-se a evidenciação por imunofluorescência de OPN e integrina $\beta 3$, assim como para fosfatase ácida (TRAP) e hematoxilina e eosina.

3.1.1 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 Biotechnology™), diluído 1:50 em PBS e 0,1% soro fetal bovino ou anticorpo monoclonal anti-OPN (mouse monoclonal IgG SC 73631, Santa Cruz Biotechnology™), 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.

Subseqüentemente, procedeu-se a 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- β 3 e anticorpo biotínido universal (kit Dako™ LSAB K0690) para marcação anti-OPN. Lavou-se 3 vezes por 5 minutos em PBS.

A marcação em fluorescência seguiu-se com incubação com estreptavidina associada ao fluoróforo FITC, na diluição de 1:200 em PBS por 60 min. 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 -20°C .

3.1.2 Técnica para marcação de fosfatase ácida resistente a tartrato (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, tartrato 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 realizou-se a contracoloração com DAPI 1:50, lavando-se logo em seguida. As lâminas foram montadas como na imunofluorescência.

3.1.3. Técnica para hematoxilina-eosina

A coloração com hematoxilina-eosina foi realizada após a desparafinização das fitas e hidratação dos cortes, como descrito previamente. As lâminas foram então imersas por 3 a 5 minutos em hematoxilina e lavadas em água destilada. Em seguida, foi feita a imersão em eosina durante 1 a 3 minutos, novo enxágüe e desidratação dos espécimes com álcoois em concentração crescente (70%, 90% e 100%) por 2 minutos cada. Prosseguiu-se a clarificação com dois banhos de xilol de 2 minutos cada e a montagem com etelan e colocação da lamínula de proteção.

3.1.4. Técnica da Reação Transcriptase Reversa em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)

Após dissecação e divisão das maxilas dos grupos experimental (n=6) e controle (n=6), as áreas correspondentes ao primeiro molar superior 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 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. Uma quantidade de 2 µg do RNA total extraído foram tratadas com RQ1 DNase (Promega), conforme o protocolo do fabricante. O RNA foi incubado com 5 M de LiCl a uma concentração final de 2,5 M a -70°C por 16 hs e então centrifugado a 14000 *rpm* por 15 min à 4°C. O pellet foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 14000 *rpm* por 15 min à 4°C. Após a evaporação do etanol 70%, o pellet foi ressuspenso em H₂O. 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 32 ciclos compreendendo 95°C por 45 seg, 52°C por 30 s eg, 72°C por 30 seg e 72 °C por 7 min. Os seguintes primers foram utilizados para amplificar a subunidade de cDNA de osteopontina de *Rattus norvegicus* (GeneBank accession no. NM_012881.2): senso 5'-GAAACTCTTCCAAGCAACTCC-3' (320–340), e antisenso, 5'-GACTGTGGGGGCGATTGGAG-3' (503-520). O tamanho esperado do produto do PCR de osteopontina era 201 bp. Primers para o gene housekeeping gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram utilizados para validar o cDNA em cada reação: senso, 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3', e antisenso, 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'. 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>). Os valores correspondentes a guanilato ciclase solúvel do RNA-m para OPN foram avaliados em relação aos níveis de RNAm do gene housekeeping GAPDH e os dados resultantes foram convertidos em gráficos e

submetidos ao teste ANOVA para avaliação da significância estatística, utilizando os programas GraphPad Prisma 4[®] e SPSS 13[®].

4 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

4.1 ARTIGO

BOAVENTURA, L.D.F; CARVALHO, J.J.; TIRRE-ARAUJO, M.S.; BARJA-FIDALGO, T.C.; Expression of osteopontin and $\alpha\beta 3$ integrin in root resorption induced by experimental orthodontic force application. Artigo a ser submetido ao **Journal of Dental Research**.

ARTIGO

**Expression of osteopontin and $\alpha\beta3$ integrin in root resorption induced by
experimental orthodontic force application**

BOAVENTURA, L.D.F; CARVALHO, J.J.; TIRRE-ARAUJO, M.S.; BARJA-
FIDALGO, T.C.

Artigo a ser submetido ao Journal of Dental Research

Expression of osteopontin and $\alpha\beta3$ integrin in root resorption induced by experimental orthodontic force application

ABSTRACT

The aim of this study was to analyse the activity of odontoclasts and the expression of osteopontin (OPN) and $\alpha\beta3$ integrin in tooth root surface during orthodontic tooth movement in rats. Mesial movement of the upper first molar was induced in 56 rats, that were killed after 3, 7, 14 and 21 days, while 24 animals were left as control, without orthodontic tooth movement. Histological preparation were made for hematoxylin-eosin staining, immunofluorescence reaction for TRAP, to detect clastic activity, and also for OPN and $\beta3$ integrin expression. The gene expression for OPN was assayed by RT-PCR in radicular tissue samples. An increase in clastic activity, which paralleled with an augmented expression of OPN and $\beta3$ integrin, were observed on the side of the tooth root surface submitted to orthodontic tooth movement, at days 3 and 7. On the days 14 and 21 after device installation, the resorption lacunae showed initial signs of repair, with decreased expression of TRAP, OPN and $\beta3$ near tooth root surface, and increased sinalization near alveolar bone surface. The analysis of the OPN gene expression, corroborated with the histological observation, showing a greater expression of OPN-mRNA in the inicial days of experiment (3 and 7) decreasing on the 14th day and reaching control values on day 21. Taken together the data indicates that orthodontic tooth root resorption occurs in the pression areas, characterized by an increase in the clastic activity, which correlates and co-localizes with the higher expression of OPN and its natural ligand, the $\beta3$ integrin.

KEYWORDS: orthodontic tooth movement, OPN, integrin

Introduction

Root resorption is the partial loss of cementum and radicular dentin from the tooth and it's one of the most frequent and unsolved problems in orthodontic therapy (BREZNIAK AND WASSERSTEIN, 2002; PIZZO *et al.*, 2007). Many efforts have been made by clinicians and researchers to prevent or minimize root resorption by identifying the predisposing risk factors. However, few attempts to prevent root resorption at the molecular and cellular levels have been made. Its cause is considered multi-factorial and involves genetic aspects (AI-QAWASMI, 2003), alveolar bone and radicular morphology (SAMESHIMA AND SINCLAIR, 2001), magnitude of orthodontic force and tooth movement type (CONSOLARO, 2005), history of previous trauma (ANDREASEN, 1985; SAMESHIMA AND SINCLAIR, 2001), as well as hormonal and immunological characteristics (NISHIOKA *et al.*, 2006).

The cells responsible for tooth root resorption are called odontoclasts and share structural and functional similarities with osteoclasts. Odontoclasts attach to the tooth root surface and are activated starting the mineralized matrix resorption process (CHAN, DARENDELILER, 2006; PIZZO *et al.*, 2007).

Osteopontin is the main non-colagenous glycoprotein from bone matrix and is also found in other mineralized tissues. It bears Arg-Gly-Asp (RGD) motif that mediates cell attachment through recognition of specific cell membrane receptors, like $\alpha_v\beta_3$ integrin in clasts (KURODA, *et al.*, 2005).

The expression of $\alpha_v\beta_3$ integrin and osteopontin in bone resorption is well established (FISCHER *et al.*, 1993; YAMAMOTO *et al.*, 1994; TALIC *et al.*, 2004) However, there is a lack of evidence about their participation in orthodontic tooth root resorption (ISHIJIMA *et al.*, 2001; TALIC *et al.*, 2006; CHUNG *et al.*, 2008).

The comprehension of molecular and cellular levels of this undesirable resorption process could contribute to prevent or minimize tooth root damage. Thus, the aim of this study was to analyse the activity of odontoclasts and the expression of osteopontin (OPN) and $\alpha\beta3$ integrin in tooth root surface during orthodontic tooth movement in rats.

Materials and Methods

Eighty Wistar male rats (300-350g) from UERJ breeding were used in this experiment. All the procedures were approved by the Animal Research Usage Avaliation Comission of the Health Sciences Center of the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ) and from the Biology Institute Roberto Alcântara Gomes of the State University of Rio de Janeiro (UERJ). The animals were divided in four groups, corresponding to the sacrifice day (3, 7, 14, 21). Orthodontic tooth movement was induced in 56 rats, refered as experimental groups, while the remaining ones were left as controls.

All animals were sedated by intraperitoneal injection of ketamine (1,33ml/kg) and xylazine (0,67ml/kg) for application of orthodontic devices. In order to induce mesial tooth movement of the left upper first molar, a 7 mm Ni-Ti closed coil spring (Morelli[®] ref.35.20.064) was tied in the cervical region of this tooth with stainless steel wire and an horizontal cervical sulcus was made around the upper incisors with a round diamond bur. The coil spring was stretched to produce a force of 50 cN, tied to the upper incisors and the wire covered with composite resin to prevent mucosal trauma. The lower incisors were cut to prevent device displacement.

After 3, 7, 14 and 21 days of orthodontic tooth movement induction, the 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 from the upper first molar were frozen in liquid nitrogen and 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 the teeth were cut at 5 μ m for histological analysis (immunofluorescence - OPN and β 3, TRAP staining and hematoxylin-eosin staining).

RNA extraction and PCR analysis

High-quality total ribonucleic acid (RNA) was isolated by using 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 μ 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 32 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 (GeneBank accession no. NM_012881.2): forward, 5'-GAAACTCTTCCAAGCAACTCC-3' (320-340), and

reverse, 5'-GACTGTGGGGGCGATTGG-3' (503-520). The expected size of the osteopontin PCR product was 201 bp. The housekeeping gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primers were used to validate the cDNA in each reaction: forward, 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3' and reverse, 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA -3'. PCR products were electrophoresis on a 1.5% agarose gel and visualized by UV exposure on a transilluminator. The semi-quantitative comparison between the samples was done 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 was measured in relation to the mRNA levels of the housekeeping gene GAPDH and the data converted into graphics and submitted to one-way analysis of variance (ANOVA) statistical test with 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, 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. Nonespecific background reaction was blocked by 3% bovine serum albumine in PBS pH 7.4 for 20 minutes, then the sections were incubated overnight with the primary policlonal antibody anti-β3 integrin and monoclonal antibody anti-osteopontin (sc-6627; sc-73631 respectively, from 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 for 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, was made following the method described by 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, sections were mounted the same way as for immunofluorescence.

Results

Forces delivered to the upper first molars with closed coil springs created areas of compression and tension. Areas of tension were characterized by

widening of the PDL. Areas of compression were characterized by narrowing and hyalinization of the PDL. Root resorption lacunae were seen on the root surface associated with areas of compression and hyalinization. In hematoxylin and eosin stained sections, multinucleated odontoclasts were seen adhering to resorption lacunae along the root surface, mostly in the 3rd and 7th day of the experiment (Figure 1 B and C). The resorptive phenomena decreased in the 14th and 21st day, when odontoclasts were absent and initial signs of repair could be observed in the lacunae, with cementoblasts and deposition of cementoid tissue (Figure 1 D and E). Animals from the control group showed no root resorption (Figure 1 A).

TRAP staining was not seen in control group animals (Figure 2 A). Experimental group animals that remained with the orthodontic device for 3 or 7 days showed intense TRAP staining cells in alveolar bone near the periodontal ligament of the pressure side, in periodontal ligament in intimate association with hyalinized tissues and in resorption lacunae close to cementum (Figure 2 B and C). 14 and 21 day experimental groups presented almost the same structures marked, but with less intense staining. Root resorption lacunae showed no TRAP positive cells (Figure 2 D and E).

Immunolabeling for OPN showed expression of this glycoprotein in clastic cells closed to alveolar bone and cementum and less intense staining in odontoblasts, cementocytes and osteocytes. Experimental animals from the 3rd and 7th day showed labeling for OPN in osteoclasts and odontoclasts localized in resorption lacunae (Figure 3 B and C). Animals from later experimental groups (14th and 21st days) stained for OPN in clastic cells closed to alveolar bone (Figure D, E and F). Control group animals showed basal staining in bone, dentin and cementum (Figure 3 A). The analysis of the OPN gene expression, corroborated

with the histological observation, showing a greater expression of OPN-mRNA in the initial days of experiment (3 and 7) decreasing on the 14th day and reaching control values on day 21. The expression of OPN gene showed statistically significant differences among experimental groups ($p < 0,05$) (Figure 4). Furthermore, the use of an antibody against the β_3 integrin subunit showed the same immunolabeling pattern of OPN staining (Figure 5). Negative controls showed no immunolabeling.

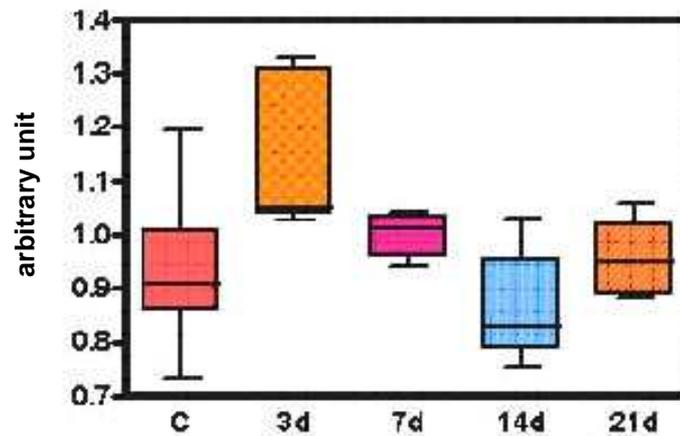


Figure 4 Graphs representing the densitometry values for OPN gene expression. There was significant difference between groups ($p < 0,05$).

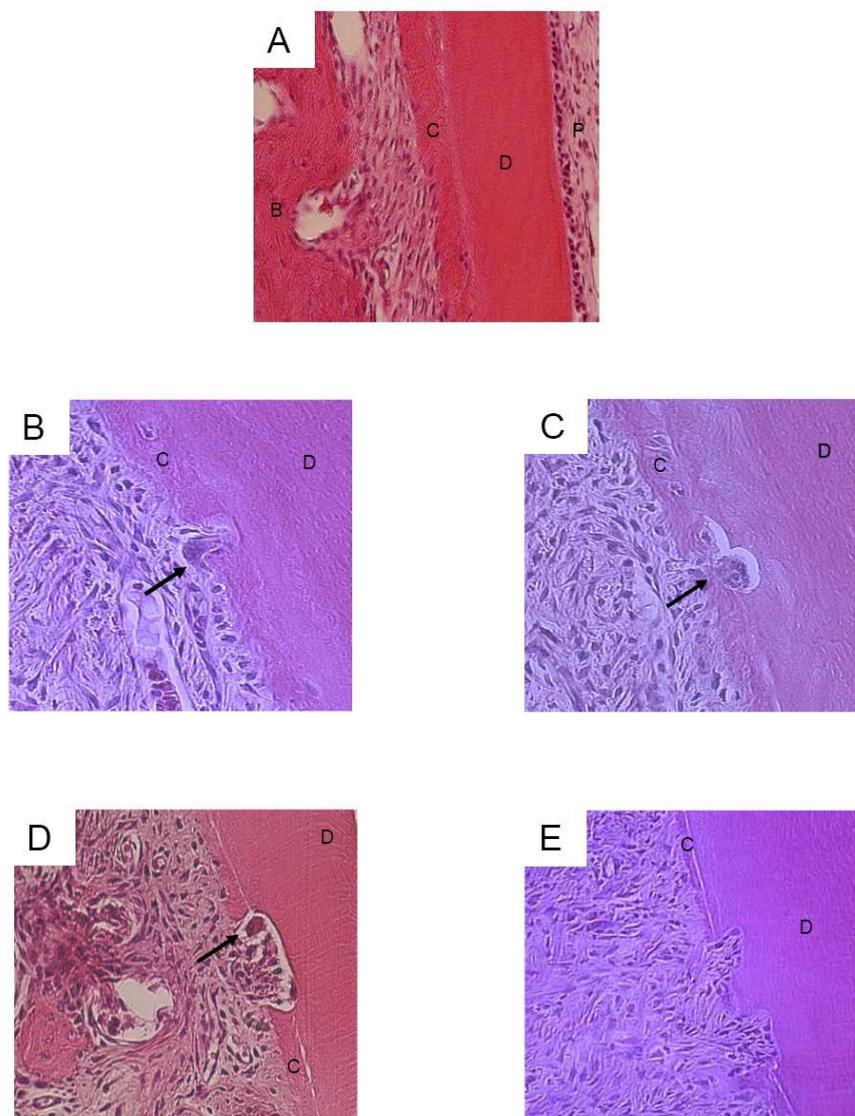


Figure 1 Morphological changes in root surface after experimental tooth movement. **A** Control group. Absence of resorption lacunae and clasts. **B** 3 days experimental group. Note the interruption of cementoblast layer and the presence of resorption lacuna with clastic cell (arrow). **C** 7 days experimental group. **D** 14 days experimental group. Resorption lacuna with clast and cementoblasts. **E** 21 days experimental group. Initial signs of repair with deposition of cementoid tissue in lacunae. Clastic cells absent. (b=bone c=cementum; d=dentin; p=pulp) original magnification 40x.

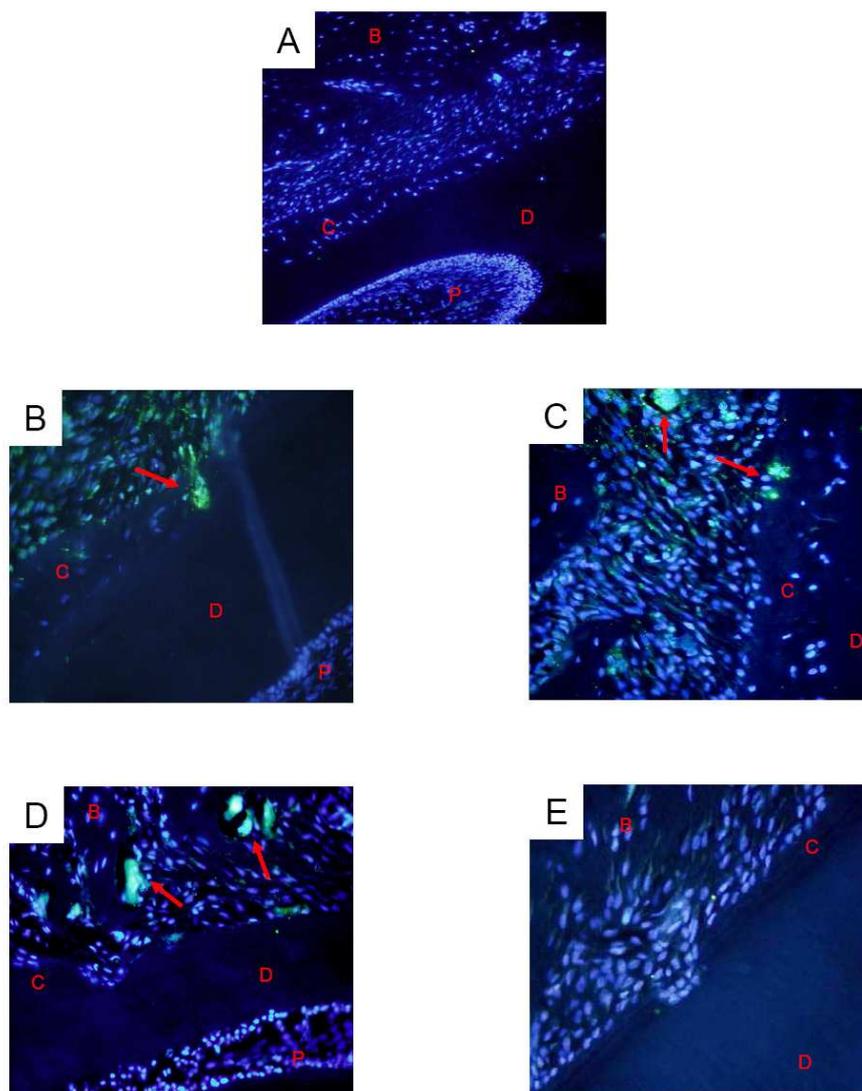


Figure 2 Fluorescent staining for TRAP (green) showing acid phosphatase expression near radicular surface after experimental tooth movement. **A** Control group. Absence of staining and resorption lacunae. **B** 3 days experimental group. Clast cell staining in resorption lacuna (arrow) **C** 7 days experimental group. Clasts in cementum and alveolar bone **D** 14 days experimental group. Expression in clastic cells near alveolar bone. Absence of clasts in resorption lacuna. **E** 21 days experimental group. Clasts and staining absent in resorption lacuna. (b=bone c=cementum; d=dentina ; p=pulp) original magnification 40x.

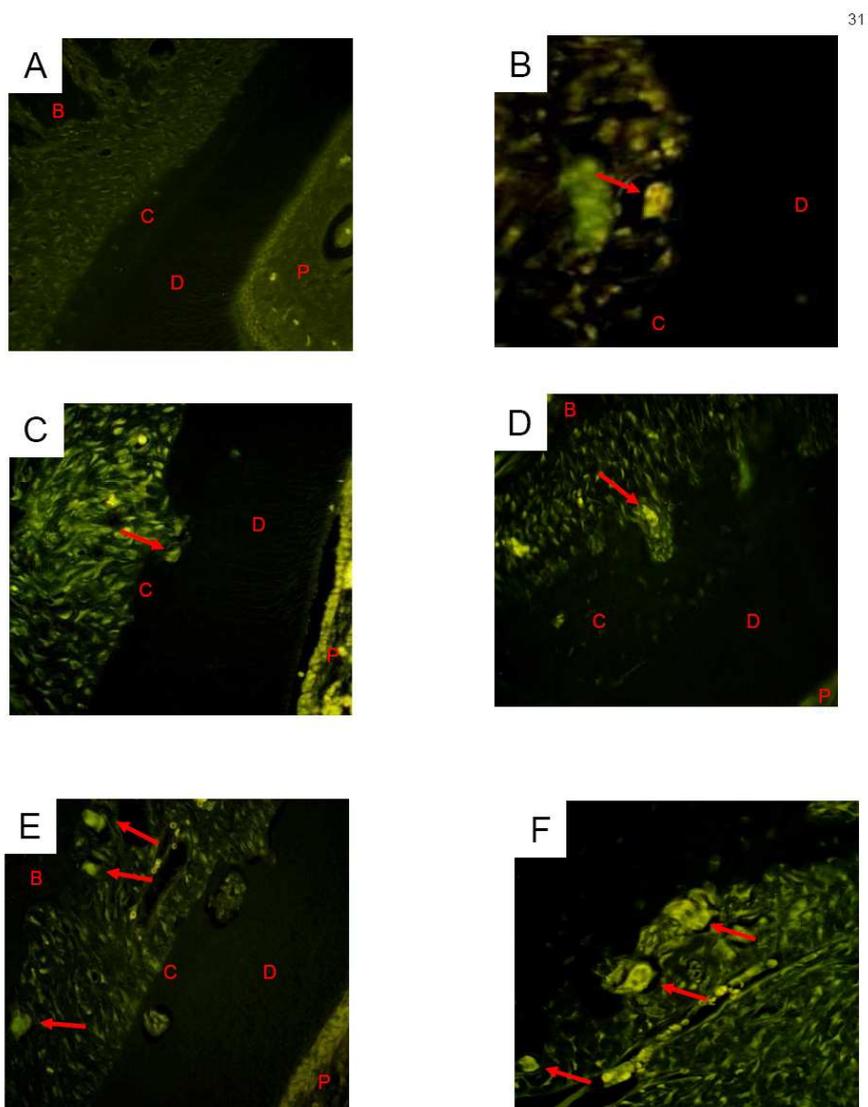


Figure 3 Immunofluorescence showing OPN staining near radicular surface after experimental orthodontic tooth movement (green). **A** Control group. Basal staining mainly in cementum, alveolar bone and odontoblasts in the pulp. **B** 3 days experimental group. Clastic cell in resorption lacuna (arrow). **C** 7 days experimental group. Resorption lacuna with marked clast. **D** 14 days experimental group. Lacuna with cementoblasts and clast cell. **E** 21 days experimental group. Resorption lacunae without clasts, which are near alveolar bone (detail in **F**). (b=bone c=cementum; d=dentina ; p=pulp) original magnification 40x.

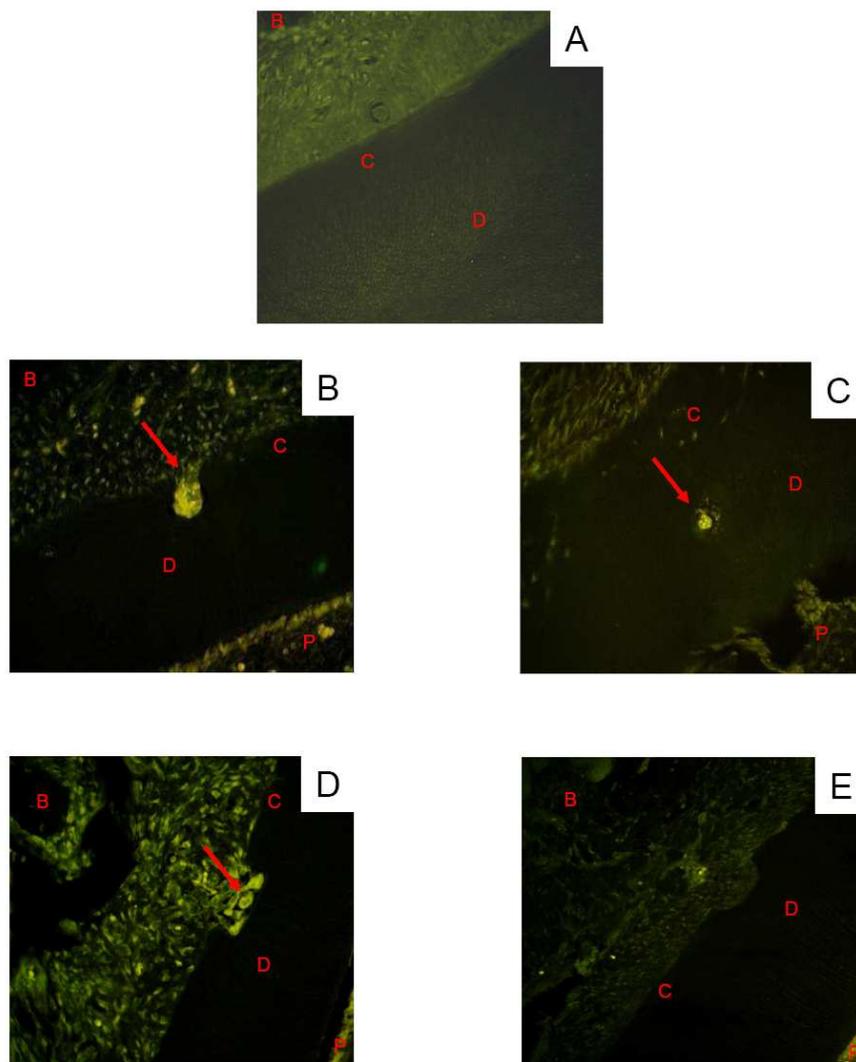


Figure 5 Immunofluorescence showing $\beta 3$ staining near radicular surface after experimental orthodontic tooth movement (green). **A** Control group. **B** 3 days experimental group. Clast stained in resorption lacuna (arrow) **C** 7 days experimental group. **D** 14 days experimental group. Lacuna with cementoblasts and clastic cell. **E** 21 days experimental group. Resorption lacunae without clasts. (b=osso c=cementum; d=dentin; p=pulp) original magnification 40x.

Discussion

The finding of high signaling of TRAP in the pressure side of experimental group animals from the 3rd and 7th days indicates clastic activity and remodeling of alveolar bone and periodontal ligament in consequence of orthodontic force application, as well as active resorption in tooth root surface. The less intense staining observed in later experimental days demonstrates a decrease in clastic activity, consistent with the resolution process of hyalinized zones and the beginning of repair process, since root resorption is directly correlated with the necrotic tissue removal from the hyalinized zone (RYGH, 1977; BRUDVIK and RYGH, 1995; MAVAGRANI *et al.*, 2005).

Immunolabeling for OPN confirmed its role in bone resorption and showed its participation in tooth root resorption, since the expression of this glycoprotein paralleled with TRAP signaling in resorptive clasts cells. OPN was also noticed in odontoblasts, cementocytes and osteocytes which is consistent with previous studies that mention OPN expression in these cellular groups and in macrophages and osteoblasts (YAMAMOTO *et al.*, 1994; BOSSHARDT *et al.*, 1998; TERAJ *et al.*, 1999; MORINOBU *et al.*, 2003). OPN is also quoted as a mediator of mechanical stress signal to osteoclasts and osteoblasts in bone resorption and formation respectively (TERAJ *et al.*, 1999; MORINOBU *et al.*, 2003). In this study, OPN expression was higher during the early active resorption process (3rd and 7th days) and decreased in later experimental days (14th and 21st), so its participation during the repair process was not noticed, which can be explained by the duration of the experiment or by the maintenance of orthodontic force during all the experimental days. Control groups showed basal staining in bone, dentin and cementum which is consistent with the fact that OPN is a component of

extracellular matrix of bone, cementum and dentin and participates in bone remodeling, dentinogenesis and cementogenesis (BRONCKERS *et al.*, 1994; MCKEE, NANJI, 1996a, 1996b; BOSSHARDT *et al.*, 1998; NANJI, 1999; DENHARDT *et al.*, 2001; MORINOBU *et al.*, 2003).

There is general agreement that an OPN - $\alpha\beta_3$ integrin interaction is important in adherence of the osteoclast to bone, as they are essential for the formation of the clear zone and the transmission of bone matrix-derived signals necessary for cytoskeletal organization to form the ruffled border in clast cells. (SHIGEYAMA *et al.*, 1996; DUONG *et al.*, 2000; DOLCE *et al.*, 2003; TALIC *et al.*, 2004; FUJIHARA *et al.*, 2006). The expression of $\alpha\beta_3$ integrin by osteoclasts is well established and it is assumed that odontoclasts and osteoclasts use the same mechanism of mineralized tissue resorption (MIYAUCHI *et al.*, 1991; NESBITT *et al.*, 1993; GIANCOTTI, 2003; KURODA *et al.*, 2005; NAKAMURA *et al.*, 2007). Our findings are consistent with this assumption, since immunolabeling for β_3 integrin subunit was seen in clast cells near alveolar bone and cementum in a way similar to OPN distribution.

Taken together the data indicates that the activity period of clast cells associated with tooth root surface, identified by TRAP staining, coincides with the higher expression periods of OPN and its receptor, the $\alpha\beta_3$ integrin, by odontoclasts, which might feature the participation of both molecules in the process of root resorption during experimental tooth movement. Once characterized the role of integrins in this process, these receptors and their ligands could become important pharmacological targets for preventive treatment of tooth root resorption and promote the increasing of orthodontic anchorage.

Bibliography

Al-Qawasmi RA, Hartsfield JK, Jr., Everett ET, Flury L, Liu L, Foroud TM, Macri JV, Roberts WE (2003). Genetic predisposition to external apical root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 123:242–252.

Andreasen JO (1985). External root resorption: its implication in dental traumatology, paedodontics orthodontics and endodontics. *Int. Endod. J.* 18(2):109-118.

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* 250:13-33.

Brezniak N, Wasserstein A. (2002). Orthodontically induced inflammatory root resorption. part II: the clinical aspects. *Angle Orthod* 72:180-184.

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* 9:833-841.

Brudvik P, Rygh P (1995) Transition and determinants of orthodontic root resorption – repair sequence. *Eur J Orthod.* v.17, p.177-188.

Chan E, Darendeliler MA (2006). Physical properties of root cementum: Part 7. Extent of root resorption under areas of compression and tension. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 129:504–510.

Chung CJ, Soma K, Rittling S, Denhardt DT, Hayata T, Nakashima K, Ezura Y, Noda M (2008). OPN Deficiency Suppresses Appearance of Odontoclastic Cells and Resorption of the Tooth Root Induced by Experimental Force Application. *J Cell Physiology* 214:614-620.

Consolaro A (2005) Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas. 2nd ed. Maringá: Dental Press editora.

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* 107:1055–1061.

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):682-686.

Duong LT, Lakkakorpi P, Nakamura I, Rodan GA (2000). Integrins and signaling in osteoclast function. *Matrix Biol* 19:97–105.

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):411–414.

Fisher J, Caulfield M, Sato M, Quartuccio H, Gould R, Garsky V, et al. (1993). Inhibition of osteoclastic bone resorption in vivo by echistatin, an arginyl-glycyl-aspartyl (RGD)-containing protein. *Endocrinology* 132:1411-3.

Fujihara S, Yokozeki M, Oba Y, Higashibata Y, Nomura S, Moriyama K (2006). Function and regulation of osteopontin in response to mechanical stress. *J Bone Miner Res* 21:956–964.

Giancotti FG (2003) A structural view of integrin activation and signaling. *Dev Cell* 4(2):149-151.

Ishijima M, Rittling SR, Yamashita T, Tsuji K, Kurosawa H, Nifuji A, Denhardt DT, Noda M. (2001). Enhancement of osteoclastic bone resorption and suppression of osteoblastic bone formation in response to reduced mechanical stress do not occur in the absence of osteopontin. *J Exp Med* 193:399–404.

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* 23:110–113.

Mavragani M, Brudvik P, Selvig KA (2005) Orthodontically induced root and alveolar bone resorption: inhibitory effect of systemic doxycycline administration in rats. *European Journal of Orthodontics* 25: 215-225.

Mckee MD, Nanci A (1996a). Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc Res Tech* 33:141–164.

Mckee MD, Nanci A (1996b) Osteopontin: an interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissue. *Connect Tissue Res* 35:197–205.

Miyauchi A, Alvarez J, Greenfield E, Teti A, Grano M, Colucci S, et al. (1991). Recognition of osteopontin and related peptides by an $\alpha v \beta 3$ integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *J Biol Chem* 266:20369-74.

Morinobu M, Ishijima M, Rittling SR, Tsuji K, Yamamoto H, Nifuji A, Denhardt DT, Noda M (2003). Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo. *J Bone Miner Res* 18:1706–1715.

Nakamura I, Duong LT, Rodan SB, Rodan GA (2007). Involvement of $\alpha v \beta 3$ integrins in osteoclast function *J Bone Miner Metab* 25:337–344.

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* 126:256-269.

Nesbitt S, Nesbit A, Helfrich M, Horto M (1993). Biochemical characterization of human osteoclasts integrins: osteoclasts express $\alpha v \beta 3$, $\alpha 2 \beta 1$ and $\alpha v \beta 1$ integrins. *J Biol Chem* 1993;268:16737-45.

Nishioka M, Ioi H, Nakata S, Nakasima A, Counts A (2006). Root resorption and immune system factors in the Japanese. *Angle Orthod* 76:103–108.

Pizzo G, Licata ME, Guiglia R, Giuliana G (2007). Root resorption and orthodontic treatment. Review of the literature. *Minerva Stomatol* 56:31–44.

Rygh P (1977). Orthodontic root resorption studied by electron microscopy. *Angle Orthod.* 47(1):1-16.

Sameshima GT; Sinclair PM (2001). Predicting and preventing root resorption: part I. Diagnostic factors. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop* 119(5):505-510.

Shigeyama Y, Grove T, Strayhorn C, Somerman M (1996). Expression of adhesion molecules during tooth resorption in feline teeth: a model system for aggressive osteoclastic activity. *J Dent Res* 75:1650-7.

Talic N, Evans CA, Daniel JC, George A, Zaki AM (2004). Immunohistochemical localization of $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor during experimental tooth movement. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop* 125(2):178-184.

Talic NF, Evans C, Zaki AM. (2006). Inhibition of orthodontically induced root resorption with echistatin, an RGD-containing peptide. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 129:252–260.

Terai K, Takano-Yamamoto T, Ohba Y, Hiura K, Sugimoto M, Sato M, Kawahata H, Inaguma N, Kitamura Y, Nomura S (1999). Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress. *J Bone Miner Res* 14:839–849.

Yamamoto TT, Takemura T, Kitamura Y (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):885-896.

5 DISCUSSÃO

A absorção radicular é um problema freqüentemente associado à aplicação de forças ortodônticas e ocorre principalmente na região apical (REITAN, 1974). No entanto, o padrão de absorção radicular nos murinos difere dos humanos, pois o primeiro molar superior dos ratos possui um terço ou mais da extensão de suas raízes formadas por cimento. As mesmas apresentam a forma de clava, em função da maior espessura do cimento na região apical. Na região média e cervical da raiz, entretanto, o cimento é delicado e caracterizado por sua discreta deposição, sendo portanto mais semelhante ao do dente humano. Desta forma, após a movimentação ortodôntica os molares dos ratos demonstraram maior ocorrência de lacunas de absorção nos terços médio e cervical de suas raízes (WALDO & ROTHBLATT, 1954; REITAN & KVAM, 1971; FURQUIM, 2002 ;REN, 2004; CONSOLARO, 2005). Corroborando estes dados, observamos histologicamente que a maioria das lacunas de absorção radicular (67%) foi observada no terço médio da raiz, seguidas pelo terço cervical (22%) e apical (11%) ao longo do tempo experimental.

A coloração pela técnica de hematoxilina-eosina dos cortes histológicos permitiu a constatação do processo absorvitivo junto à superfície radicular no lado de pressão. Os fenômenos absorvitivos foram mais evidentes no 3^o e 7^o dias , com a presença de clastos nas lacunas de absorção. (Figura 1 B e C, página 29) e reduzido no 14^o e 21^o dias, quando os odontoclastos estavam ausentes e

observaram-se sinais iniciais de reparo da lacuna, com a presença de cementoblastos e ligeira deposição de tecido cementóide (Figura 1 D e E, página 29). Nos animais do grupo controle a absorção radicular estava ausente (Figura 1A, página 29).

A marcação para fosfatase ácida resistente a tartrato (TRAP) não foi observada nos animais do grupo controle (Figura 2 A, página 30) 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 (JANCKILA, HALLEEN, 2003; FILGUEIRA, 2004). Nos grupos experimentais que permaneceram com o dispositivo por 3 ou 7 dias houve intensa marcação para TRAP no osso alveolar próximo ao ligamento no lado de pressão, assim como no ligamento periodontal e em lacunas de absorção junto ao cimento. 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 (Figura 2 B e C, página 30). Nos grupos experimentais de 14 e 21 dias evidenciou-se marcação no osso alveolar e marcação menos intensa no ligamento periodontal. As lacunas de absorção não apresentaram células TRAP-positivas (Figura 2 D e E, página 30). Estas características demonstram um decréscimo na atividade clástica, condizente com o processo de resolução da zona de hialinização e início do processo de reparo, já que a absorção radicular encontra-se diretamente relacionada com a remoção do tecido necrótico da zona hialinizada. (REITAN, 1971; RYGH, 1977; BRUDVIK & RYGH, 1995).

A osteopontina é a principal proteína não-colágena da matriz óssea e contém a seqüência glicina-arginina-ácido aspártico, que ao ser reconhecida pela

integrina $\alpha_v\beta_3$, expressa pelos osteoclastos, modula a adesão celular. Desta forma, a OPN exerce importante papel na promoção e regulação da adesão e espalhamento dos clastos pela superfície mineralizada durante a absorção (DENHARDT, NODA, O'REGAN *et al.*, 2001; SHIMAZU, NANJI, AOBA, 2002).

A marcação pela técnica de imunofluorescência para OPN mostrou expressão desta glicoproteína nas células clásticas associadas ao osso alveolar e ao cimento radicular e de forma menos intensa nos odontoblastos, cementócitos e osteócitos, o que está de acordo com a literatura, que cita a presença de OPN nestes grupos celulares e ainda em macrófagos e osteoblastos (YAMAMOTO, TAKEMURA, KITAMURA *et al.*, 1994; BOSSHARDT, ZALZAL, MCKEE *et al.*, 1998; TERAJ, YAMAMOTO, OHBA *et al.*, 1999; MORINOBU, ISHIJIMA, RITTLING *et al.*, 2003). Nos animais do grupo controle observou-se marcação basal de OPN, o que se justifica por ser componente da matriz extracelular do tecido ósseo, cimento e dentina, participando da remodelação óssea, dentinogênese e cementogênese (BRONCKERS, FARACH-CARSON *et al.*, 1994; YAMAMOTO, TAKEMURA, KITAMURA *et al.*, 1994; MCKEE & NANJI, 1996a, 1996b; D'ERRICO, MACNEIL *et al.*, 1997; BOSSHARDT, ZALZAL *et al.*, 1998; NANJI, 1999). Nos grupos experimentais de 3 e 7 dias observou-se a marcação para OPN especialmente nos osteoclastos e odontoclastos situados nas lacunas de absorção (Figura 3 B e C, página 31). Nos grupos experimentais de 14 e 21 dias, a marcação predominante para OPN ocorreu em células clásticas associadas ao tecido ósseo. Estes dados relacionam fortemente a expressão de OPN com a atividade absorvitiva dos clastos, que se tornou mais evidente neste trabalho durante os dias iniciais da movimentação ortodôntica. (Figura 3 D, E e F, página 31).

A análise de expressão gênica de OPN no tecido radicular confirmou os resultados histológicos associando a atividade absorvitiva com a presença desta proteína de matriz. A expressão de osteopontina mostrou diferença estatisticamente significativa nos diferentes tempos do experimento ($p < 0,05$), sendo maior durante os períodos de maior atividade de absorção, o que confirmou seu papel neste processo, principalmente em resposta ao estresse mecânico (KATSUMI & ORR, 2004; FUJIHARA, YOKOZEKI, OBA, *et al.*, 2006). A expressão gênica da OPN foi maior no 3^o e 7^o dias do experimento, diminuindo no 14^o e voltando a valores basais no 21^o dia. (Figura 4, página 28). Estes achados indicam a participação da OPN não apenas no processo de absorção óssea, como já conhecido, mas também no processo de absorção radicular decorrente da movimentação ortodôntica (KURODA, BALAM, SAKAI, *et al.*, 2005; CHUNG, SOMA, RITTLING, *et al.*, 2008)

Interessantemente a marcação para subunidade β_3 da integrina $\alpha_v\beta_3$ pelos clastos acompanhou o mesmo padrão observado pela OPN, corroborando a esperada interação entre ambas no processo de adesão celular à superfície mineralizada (Figura 5, página 32) (MACNEIL, BERRY, DERRICO, *et al.*, 1995; HORTON, 1995 ; MURRAY, 2006; NAKAMURA, DUONG, RODAN, *et al.*, 2007). Na figura a seguir pode-se observar, em um maior aumento, a localização da marcação para a integrina junto à face absorvitiva do clasto.

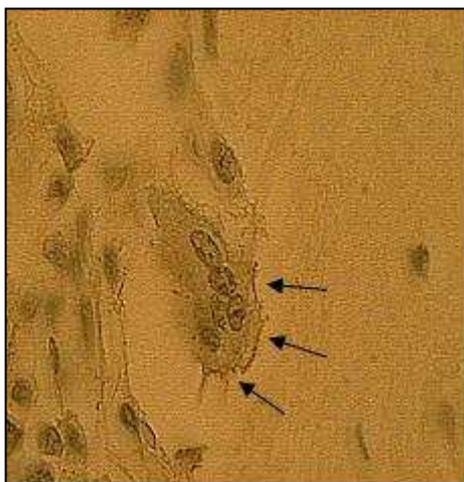


Figura 1 Marcação por imunohistoquímica para integrina β_3 (seta) em face ativa de clasto (aumento original 100x).

Tomados em conjunto, os dados mostraram que o período de atividade das células clásticas associadas à superfície radicular, identificadas pela TRAP, coincide com os períodos de maior expressão de OPN e de seu receptor, a integrina β_3 , o que caracteriza a participação de ambas as moléculas no processo ativo de absorção radicular.

A expressão de OPN e β_3 pelos odontoclastos, denota que há semelhança entre os mecanismos de absorção radicular e óssea, apesar de envolverem tecidos (osso, cimento e dentina) com características distintas entre si.

6 CONCLUSÃO

6.1 As lacunas de absorção estiveram presentes em todos os tempos experimentais, predominantemente no terço médio da raiz, apresentando características de atividade absorvitiva nos tempos iniciais e sinais de reparo nos tempos finais do experimento.

6.2. Foi encontrada atividade, bem como expressão de OPN e integrina $\alpha\beta3$ nos clastos associados a superfície radicular dos molares superiores de ratos após a aplicação de força ortodôntica.

6.3 A expressão de TRAP, OPN e $\alpha\beta3$ pelos odontoclastos durante o experimento deu-se de forma mais intensa nos períodos iniciais, decrescendo nos períodos finais, demonstrando a participação destas proteínas na absorção radicular decorrente da movimentação dentária induzida.

7 RECOMENDAÇÕES

O presente trabalho demonstrou a expressão de OPN e integrina $\alpha\beta3$ nos clastos associados a superfície radicular dos molares superiores de ratos, evidenciando indícios da participação destas proteínas no mecanismo de absorção radicular decorrente da aplicação de força ortodôntica. No entanto, para o esclarecimento da sua real participação neste processo, necessita-se que esta investigação seja ampliada. A fim de promover o enriquecimento dos dados obtidos sugere-se:

- a utilização de microscopia eletrônica de transmissão para determinar, com maior precisão, a localização nas estruturas celulares e de matriz das proteínas estudadas;
- a investigação do comportamento de outras proteínas associadas ao mecanismo de osteoclastogênese, como RANK-L e osteoprotegerina e sua relação com a OPN e integrina $\alpha\beta3$;
- a verificação do papel da OPN no processo de reparo após a absorção radicular, através de um maior tempo experimental ou da supressão da força ortodôntica nos períodos já avaliados;
- a utilização da reação em cadeia polimerase para quantificar OPN e osteoprotegerina no fluido crevicular gengival de pacientes em tratamento ortodôntico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACAR, A.; CANYUREK, U. et al. Continuous vs. discontinuous force application and root resorption. **Angle Orthod.** v.29, n.2, p. 159-164, Apr.1999.

AL-QAWASMI,R.A., HARTSFIELD,J.K.,et al. Genetic predisposition to external apical root resorption. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**v.123,n.3, p. 242-252, Mar.2003.

AL-QAWASMI,R.A., HARTSFIELD,J.K., et al. Root resorption associated with orthodontic force in inbred mice: genetic contributions. **Eur. J. Orthod.**, v.28, p. 13-19, Dez.2005.

ANDREASEN, J.O. External root resorption: its implication in dental traumatology, paedodontics orthodontics and endodontics. **Int. Endod. J.** v.18, n.2, p. 109-118. Apr. 1985.

BHASKAR, S.N. **Histologia e Embriologia Oral de Orban.** 10^a ed. Editora Artes Médicas, São Paulo, 1989, 501p.

BLAIR, H.C.;ZAIDI, M.Osteoclastic differentiation and function regulated by old and new pathways. **Rev Endocr Metab Disord.** v.7,p.23–32. 2006.

BOSSHARDT, D.D.; ZALZAL, S., et al. Developmental Appearance and Distribution of Bone Sialoprotein and Osteopontin in Human and Rat Cementum. **Anat. Rec.** v.250,p.13–33. 1998.

BOSSHARDT, D.D. Are Cementoblasts a Subpopulation of Osteoblasts or a Unique Phenotype? **J Dent Res.** v.84, n.5, p.390-406. 2005

BOYLE, W.J.; W. SIMONET, S.; LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature.** v.423, p.336-342. May 2003.

BREZNIAK, N.; WASSERSTEIN, A. Root resorption after orthodontic treatment : part I- literature review. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.** v.103, n. 1, p. 62-68.Jan.1993 a.

BREZNIAK, N.; WASSERSTEIN, A. Root resorption after orthodontic treatment : part II - literature review. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.** v.103, n. 2, p. 138-146. Feb.1993 b.

BREZNIAK, N.; WASSERSTEIN, A. Orthodontically Induced Inflammatory Root Resorption.Part I: The Basic Science Aspects. **Angle Orthod.** v.72, p. 175-179. 2002a.

BREZNIAK, N.; WASSERSTEIN, A. Orthodontically Induced Inflammatory Root Resorption.Part II:The Clinical Aspects. **Angle Orthod.** v.72, p. 180-184. 2002b.

BRONCKERS, A.L.; FARACH-CARSON, M.C. ; 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, p.833-841.1994.

BRUDVIK, P.; RYGH, P.; FARRELL, L.; YEN, E. Orthodontic root resorption: resorptive cell activity demonstrated by TRAP stain. **J Dent Res.** v.72, p.756.1992.

BRUDVIK, P.; RYGH, P. The initial phase of orthodontic root resorption incident to local compression of the periodontal ligament. **Eur. J. Orthod.** v.15, p.249-263. 1993.

BRUDVIK, P.; RYGH, P. Multinucleated cells remove the main hyalinized tissue and start resorption of adjacent root surfaces. **Eur J Orthod.** v.16, p.265-273.1994.

BRUDVIK, P.; RYGH, P. Transition and determinants of orthodontic root resorption –repair sequence. **Eur J Orthod.** v.17, p.177-188. 1995.

BUTLER, W.T. Dentin matrix proteins. **Eur J Oral Sci.** v.106, p.204-210. 1998.

BUTLER, W.T.; BRUNN, J.C.; QIN, C. Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis. **Connect Tissue Res** v.44, p.171-178. 2003.

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

CHRISTOFFERSEN, J.; LANDIS, W.J. A contribution with review to the description of mineralization of bone and other calcified tissues in vivo. **Anat Rec.** v.230, p.435-450. 1991.

CHUNG, C.J.; SOMA, K., et al. OPN Deficiency Suppresses Appearance of Odontoclastic Cells and Resorption of the Tooth Root Induced by Experimental Force Application. **J Cell Physiology.** v.214, p.614-620. 2008.

COLE, A.A.; WALTERS, L.M. Tartrate-resistant Acid Phosphatase in Bone and Cartilage Following Decalcification and Cold-Embedding in Plastic. **J Histochem Cytochem.** v. 35, n. 2, p. 203-206. 1987

CONSOLARO, A. et al. Conceitos de genética e hereditariedade aplicados à compreensão das reabsorções dentárias durante a movimentação ortodôntica. **R.Dental Press Ortodon. Ortop. Maxilar.** v.9, n.2, p. 79-94. 2004.

CONSOLARO, A. **Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas.** 2ª ed. Dental Press editora, Maringá, 2005, 616p.

COUNTS, A.L., WIDLAK, R.A. Generalized idiopathic external root resorption. **J.Clin. Orthod.** v.27, n.9, p. 511-513, Sep. 1993

DENHARDT, D.T.; GUO, X. Osteopontin: a protein with diverse functions. **The FASEB Journal.** v.7, p.1475 -1482. Dec.1993.

DENHARDT, D.T.; NODA, M., et al. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. **J Clin Invest** v.107, p.1055 –1061. 2001.

D'ERRICO, J.A.; MACNEIL, R.L., et al. Expression of bone associated markers by tooth root lining cells, in situ and in vitro. **Bone.** v.20, p.117-126. 1997.

DOLCE, C.; VAKANI, A., et al. Effects of echistatin and an RGD peptide on orthodontic tooth movement. **J. Dent. Res.** v. 82, n.9, p. 682-686. 2003.

DUONG, L.T.; LAKKAKORPI, P., et al. Integrins and signaling in osteoclast function. **Matrix Biol.** v.19, p.97-105. 2000.

FEIGE, U. Osteoprotegerin. **Ann Rheum Dis** v.60, n.3, p.81-84. 2001.

FILGUEIRA. 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, p. 411-414. 2004.

FISCHER, J.E.; CAULFIELD, M.P., et al. Inhibition of osteoclastic bone resorption in vivo by echistatin, an "arginyl-glycyl-aspartyl" (RGD) - containing protein. **Endocrinology.** v.132, n.3, p.1411-1413. 1993.

FISHER, L.W.; TORCHIA, D.A., FOHR, B., et al. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. **Biochem Biophys Res Commun.** v.280, p.460-465. 2001.

FLORES, M.E.; NORGARD, M., et al. RGD-directed attachment of isolated rat osteoclasts to osteopontin, bone sialoprotein, and fibronectin. **Exp Cell Res.** v.201, p.526-530, 1992.

FUJIKAWA, Y.; SABOKBAR, A., et al. The effect of macrophage-colony stimulating factor and other humoral factors (interleukin-1, -3, -6 and -11, tumour necrosis factor, granulocyte macrophage-colony stimulating factor) on human osteoclast formation from circulating cells. **Bone.** v.28, p.261-267. 2001

FUJIHARA, S ; YOKOZEKI, M., et al. Function and regulation of osteopontin in response to mechanical stress. **J Bone Miner Res.** v.21, n.6, p.956-964. 2006.

FURQUIM, L. Z. Perfil endocrinológico de pacientes ortodônticos com e sem reabsorções dentárias: correlação com a morfologia radicular e da crista óssea alveolar. 2002. 122 f. **Tese (Doutorado em Odontologia)** – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru.

GIANCOTTI, F.G. A structural view of integrin activation and signaling. **Dev Cell.** v.4, n.2, p.149-151. Feb.2003.

GREENE, E. C., **Anatomy of the rat.** Hafner Publishing Co, New York, 1955, 370p.

HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores.** 1ª. edição, Livraria Roca Ltda, São Paulo, 1993.

HAYMAN, A.R.; COX, T.M. Tartrate-resistant acid phosphatase knockout mice. **J Bone Miner Res.** v.18, p.1905-1907. 2003.

HOLLIDAY, L.S.; WELGUS, H.G., et al. Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. **J Biol Chem.** v.272, p.22053-22058, 1997.

HORTON, M.A. Interaction of connective tissue cells with the extracellular matrix. **Bone.** v.17, n.2, p.51S-53S. Aug.1995.

JANCKILA, A.J.; HALLEEN, J.M. Introduction: Recent advances in TRACP/PAP biochemistry, molecular biology, and clinical application. **J Bone Miner Res.** v.18, n.10, p.1892-1893, 2003.

KAMADA, K.M.; PANKOV, R., et al. Dimensions and dynamics in integrin function. **Braz J Med Biol Res.** v.36, p.959-966, 2003.

KATSUMI, A. ;ORR, W.A. Integrins in mechanotransduction. **J Biol Chem.** v.279, n.13, p.12001-12004, 2004.

KURODA, S.; BALAM, T.A., 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, p.110–113. 2005.

LUCRASHENAR, N.; CLEMENTS, J.L. Signaling mechanisms utilized by antigen receptors and integrins: common intermediates, different outcomes? **Front Biosc.** v. 12, p.419-436. Jan.2007.

LINDSKOG, S.; BLOMLOF, L., 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, p. 390-395. Aug.1987.

MACNEIL, R.L.; BERRY, J.;DERRICO, J. et al. Role of two mineral associated adhesion molecules,osteopontin and bone sialoprotein during cementogenesis. **Connect Tissue Res.** v.33, p.1-7. 1995.

MACNEIL, R.L.; BERRY, J.; et al. Expression of bone sialoprotein mRNA by cells lining the mouse tooth root during cementogenesis. **Arch Oral Biol.** v.41, p.827-835. 1996.

MASARACHIA, P.;YAMAMOTO, M., et al. Histomorphometric evidence for echistatin inhibition of bone resorption in mice with secondary hyperparathyroidism. **Endocrinology.** v. 139, p.1401-1410.1998.

MCKEE, M.D.; NANCI, A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation,turnover, and repair. **Microsc Res Tech.** v.33, p.141–164. 1996a.

MCKEE, M.D.; NANCI A. Osteopontin: an interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissue. **Connect Tissue Res.** v.35,p.197–205. 1996b.

MINKIN, C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. **Calcif Tissue Int** v.34, p.285. 1982.

MIYAUCHI, A.S.; ALVAREZ, J.,et al. Recognition of Osteopontin and Related Peptides by an $\alpha\beta 3$ Integrin Stimulates Immediate Cell Signals in Osteoclasts. **J Biol Chem.** v. 266, n.30, p. 20369-20374, 1991.

MORINOBU, M; ISHIJIMA, M., 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, p.1706–1715. 2003.

MORITA, H.; YAMASHITA, H., et al. The collagenolytic activity during root resorption of bovine deciduous tooth. **Arch Oral Biol.** v.15,n.6, p.503-508. Jun.1970.

MURRAY, C.M. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. **Eur J Orthod.** v.28, p.221–240. 2006.

NAKAMURA, I.;TANAKA, H.;RODAN, G.A., et al. Echistatin inhibits the migration of murine perfusion osteoclasts and the formation of multinucleated osteoclast-like cells. **Endocrinology.** v.139, p.5182-5193. 1998.

NAKAMURA, I; DUONG, L.T; RODAN, S.B. et al. Involvement of avb3 integrins in osteoclast function. **J Bone Miner Metab** v.25, p.337–344. 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, p.256-269. 1999.

NEWMAN, W.G. Possible etiologic factors in external root resorption. **Am.J. Orthod.** v.67, n.5, p.522-539, May 1975.

NISHIOKA, M.;NAKATA, S.; NAKASIMA, A.; COUNTS, A. Root resorption and immune system factors in the Japanese. **Angle Orthod** . v.76, p.103–108. 2006.

OTTOLENGUI, R. *Apud* RUELLAS, A.C.O. Influência do uso de anovulatórios na movimentação ortodôntica – estudo em coelhos. 1999. 159 f. **Tese (Doutorado em Odontologia)** – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PHILLIPS, J.R. Apical root resorption under orthodontic therapy. **Angle Orthod.**, v.25, n. 1, p.1-22, Jan .1955.

PIZZO, G;LICATA, M.E; GUIGLIA, R; GIULIANA, G. Root resorption and orthodontic treatment. Review of the literature. **Minerva Stomatol.** v.56, p.31–44, 2007.

QIN, J; VINOGRADOVA,O., et al.Integrin bidirectional signaling:a molecular view.**PLoS Biol.**v.2,p.726-729.Jun.2004.

REITAN, K. The initial tissue reaction incident to orthodontic tooth movement. **Acta Odontol Scand.** Supp.6. 1951.

REITAN, K. Clinical and histological observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. **Am.J.Orthod.** v.53, n. 10, p.721-745, Oct .1967.

REITAN, K.; KVAM, E. Comparative behavior of human and animal tissue during experimental on tooth movement. **Angle Orthod.** v.41, n. 1, p.1-14, Jan.1971.

REITAN, K. Initial tissue behavior during apical root resorption. **Angle Orthod.** v.44, n. 1, p.68-82, Jan .1974.

REN, Y. 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, p.483-490. 2004.

ROBEY, P.G. Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function. **Connect Tissue Res.**v.35, p.131-136.1996.

RODAN, G.A.; MARTIN,T.J. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption: a hypothesis. **Calcif. Tissue Int.** v.33, n.4, p.349-351, 1981.

RODY, W.J; KING, G.J., et.al. Osteoclast recruitment to site of compression in orthodontic tooth movement. **Am.J.Orthod.Dentofacial Orthop.** v.120, n.5, p.477-489, Nov.2001.

ROODMAN, G.D. Cell biology of the osteoclast. **Exp Hematol.** v.27, p.1229–1241.1999.

RYGH, P. Orthodontic root resorption studied by electron microscopy. **Angle Orthod.** v.47, n. 1, p.1-16, Jan.1977.

SALHOUB, V.; ELLIOTT, G., et al. Characterization of osteoclast precursors in human blood. **Br J Haematol.**v.111, p.501–512. 2000.

SAMESHIMA, G.T.; SINCLAIR, P.M. Predicting and preventing root resorption: part I. Diagnostic factors. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.** v.119, n. 5, p. 505-510. May.2001a.

SAMESHIMA, G.T.; SINCLAIR, P.M. Predicting and preventing root resorption: part II. Treatment factors. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.** v.119, n. 5, p. 511-515. May.2001b.

SATO, M. et al. Echstatin is a potent inhibitor of bone resorption in culture. **J.Cell. Biol.** v.111, p.1713-1723. 1990.

SCHWARTZ, M.A. Integrin signaling revisited. **Trends Cell Biol.** v.11, n.12, p.466-470. Dec.2001.

SHIMAZU, Y; NANCI, A ;AOBA, T. Immunodetection of osteopontin at sites of resorption in the pulp of rat molars. **J Histochem Cytochem.** v.50, p.911– 921. 2002.

SODEK, J.; ZHU, B., et al. Novel functions of the matricellular proteins osteopontin and osteonectin/SPARC. **Connect Tissue Res.** v. 43, p.308-319. 2002.

TALIC, N.F.; EVANS, C.A., et al. Immunohistochemical localization of $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor during experimental tooth movement. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.** v.125, n.2, p.178-184. Feb.2004.

TALIC, N.F.;EVANS, C.A., et al. Inhibition of orthodontically induced root resorption with echistatin, an RGD-containing peptide. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.** v.129, n.2, p.252-260. Feb.2006.

TERAI, K; YAMAMOTO, T. et al. Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress. **J.Bone Min Res**, v14, n.6, p.839-848.1999.

TSUBOI, H.; MATSUI, Y., et al. Tartrate resistant acidic phosphatase (TRAP) positive cells in rheumatoid synovium may induce the destruction of articular cartilage. **Ann Rheum Dis.** v.62, p.196–203. 2003.

TSUJI, Y., YAMAZA, T., 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, p.359–369. 2001.

WALDO, C.; ROTHBLATT, J. Histological response to tooth movement in the laboratory rat. **J Dent Res.** v.33, p. 481-6. 1954.

WALSH, N.C.; CAHILL, M.; CARNINCI, P. et al. Multiple tissue-specific promoters control expression of the murine tartrate-resistant acid phosphatase gene. **Gene** .v.307, p.111–123. 2003.

WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I.;NIEWIAROWSKI, S. et al. Structural requirements of equistatin for therecognition of $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins. **J. Biol.Chem.** v.274, n.53, p. 37809-37814. Dec.1999.

YAMAMOTO, M.; FISHER, J.E., et al. The integrin ligand echistatin prevents bone loss in ovariectomized mice and rats. **Endocrinology.** v.139, n.3, p.1411-1419. 1998.

YAMAMOTO, T.T.; TAKEMURA, T.;KITAMURA, Y. 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 Histochem.** v.42, n.7, p. 885-896. 1994.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)