NATASHA D` ANDREA MATEUS MARQUES

Estudo da expressão das moléculas reguladoras da remodelação do osso alveolar durante a movimentação ortodôntica com força contínua em ratos tratados com alendronato sódico

**São Paulo
2015**

NATASHA D` ANDREA MATEUS MARQUES

Estudo da expressão das moléculas reguladoras da remodelação do osso alveolar durante a movimentação ortodôntica com força contínua em ratos tratados com alendronato sódico

Versão Corrigida

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor,
pelo programa de Pós em
Biomateriais e Biologia Oral.**

**Área de Concentração:
Biomateriais e Biologia Oral**

**Orientador: Prof. Dr. Victor Elias
Arana-Chavez**

**São Paulo
2015**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Marques, Natasha D'Andrea Mateus.

Estudo da expressão das moléculas reguladoras da remodelação do osso alveolar durante a movimentação ortodôntica com força contínua em ratos tratados com alendronato sódico / Natasha D'Andrea Mateus Marques ; orientador Victor Elias Arana-Chavez. -- São Paulo, 2015.

77p. : fig. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Biomateriais e Biologia Oral. Área de Concentração: Biomateriais e Biologia Oral. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Alendronato. 2. Bifosfonato. 3. Movimentação ortodôntica. 4. Osteoclasto. 5. Remodelação óssea. I. Arana-Chavez, Victor Elias. II. Título.

Marques NDM. Estudo da expressão das moléculas reguladoras da remodelação do osso alveolar durante a movimentação ortodôntica com força contínua em ratos tratados com alendronato sódico. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento_____

Dedico este trabalho a

Deus, que me
concedeu a vida, me ilumina e me guia todos
os dias.

Ao meu querido
esposo Thales Marques que esteve ao meu lado
e sempre me incentivou e apoiou na realização
desse trabalho.

Aos meus pais José
Carlos e Adenira que nunca mediram esforços
para garantir minha formação e me apoiaram em
todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez por todas as oportunidades a mim concedidas e pela confiança no meu trabalho. Sua competência científica é inspiradora e revela o grande pesquisador. Obrigada pelos conselhos, pela sua amizade, pela paciência e ensinamentos. Foi um grande privilégio trabalhar com você.

A Vivian Bradaschia Correa, minha amiga, que esteve presente em todos os momentos deste trabalho, ajudando em tudo o que foi preciso. Obrigada pelo seu exemplo de competência e dedicação.

A CAPES, pelo auxílio financeiro, o qual foi muito importante para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço a Universidade de São Paulo, que possibilitou a realização desse trabalho.

A todos os professores do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral pelos ensinamentos: Prof. Rafael Yague Ballester, Prof. Carlos Eduardo Franci, Prof. Igor Studart Medeiros, Prof. Paulo Francisco Cesar, Prof. Leonardo Eloy Rodrigues Filho, Prof. Roberto Ruggiero Braga, Profa. Alyne Simões Gonçalves.

As queridas amigas que fiz no Laboratório de Biologia Oral, Lorraine e Mariana por todos os momentos que passamos juntas, pelas risadas, pelas conversas, companhias na imunohistoquímica.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Oral: Giovanna de Castro, Claudia Rothbarth, Tatiani Donato, Eloiza Resende, Erika de Paula, Cintia Yuki, Bernar Benites, Luana Campos, Juliana Castro, Gabriela Magliano, Filipi Pereira, Ana Carolina Romero.

Aos meus colegas de pós-graduação: Erik de Lima, Pedro Albuquerque, Alexander Nishida, Ana Carolina Freitas, Simone Peixe, Ricardo Sgura, Ranulfo Miranda, Bruno Lopes e Ana Paula Zen.

Aos funcionários do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral: Rosa Cristina Nogueira, Elidamar Guimarães e Edeleine Mario, secretárias do departamento; Elis Chinen, técnica do laboratório de Biologia Oral; Douglas Nadal, técnico do Laboratório de Bioquímica; Antônio, técnico de Materiais.

A bibliotecária Vânia M. B. de Oliveira Funaro, pela ajuda prestada durante a correção deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente participaram da realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

*“Só se pode alcançar um grande
êxito quando nos mantemos fiéis a nós
mesmos”.*

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Marques NDM. Estudo da expressão das moléculas reguladoras da remodelação do osso alveolar durante a movimentação ortodôntica com força contínua em ratos tratados com alendronato sódico [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão original.

A movimentação dentária ortodôntica ocorre através de dois processos, nos quais o osso alveolar é reabsorvido nas áreas de pressão, enquanto que novo osso é formado na área de tração. O processo de reabsorção óssea ocorre pela ação de células multinucleadas, os osteoclastos. Os bisfosfonatos constituem um grupo de fármacos com propriedade de inibir a reabsorção óssea, foi utilizado no presente estudo com a finalidade de interferir na remodelação óssea induzida ortodonticamente. Para isso, força contínua de 15 cN foi aplicada aos primeiros molares superiores de ratos machos Wistar de 2 1/2 meses, utilizando uma biomecânica com fios superelásticos. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: 1) O grupo controle constituído por dezoito ratos, os quais foram injetados solução salina por 7 dias antes da instalação da biomecânica passiva, que permaneceu por 3, 10 e 18 dias; 2) Dezoito animais foram tratados com ALN (dose 2,5 mg/Kg) por 7 dias antes da instalação da biomecânica passiva que permaneceu por 3, 10 e 18 dias; 3) Dezoito animais foram tratados com alendronato com a mesma dose citada acima por 7 dias antes da instalação da biomecânica ativa que permaneceu por 3, 10 e 18 dias; 4) Dezoito animais foram injetados com solução salina 7 dias antes da instalação da biomecânica ativa que permaneceu por 3, 10 e 18 dias. As maxilas foram fixadas com 4% de formaldeído + 0,1% de glutaraldeído, descalcificadas em EDTA a 4,13% e incluídas em parafina ou resina Spurr. Os cortes foram corados com HE para análise morfológica. Alguns cortes foram submetidos à imuno-histoquímica para detecção de RANKL e OPG. Foi utilizado o método TRAP, marcador de osteoclastos e microscopia eletrônica de transmissão para análise ultraestrutural. Alguns espécimes tiveram a cortical óssea vestibular do primeiro molar superior congelada em nitrogênio líquido para análise da expressão de RANKL por Western Blotting. O ALN inibiu a reabsorção óssea e radicular de todos os grupos tratados. As células clásticas apresentaram-se em estado latente. No grupo da movimentação ortodôntica o osso alveolar foi remodelado e com 18

dias a superfície radicular apresentou-se reabsorvida e o TRAP revelou clastos ativos, achados confirmados pela microscopia eletrônica de transmissão. A expressão de RANKL, molécula ativadora de células clásticas, não foi inibida pela droga. A expressão de OPG foi aumentada nos animais tratados. Os resultados demonstram que o uso de alendronato sódico na movimentação ortodôntica não interfere no recrutamento dos osteoclastos, ele aparentemente inibe sua ativação, o que pode interferir no processo de remodelação óssea e talvez diminua a quantidade de movimentação dentária.

Palavras-Chave: Alendronato. Bisfosfonato. Movimentação Ortodôntica. Osteoclasto. Remodelação óssea.

ABSTRACT

Marques NDM. Study of expression of regulatory molecules of the alveolar bone remodeling during orthodontic movement with continuous force in rats treated with alendronate [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão original.

Orthodontic tooth movement occurs through two processes in which the alveolar bone is resorbed in the pressure areas, whereas new bone is formed in the tension area. The bone resorption occurs by multinucleated cell, the osteoclasts. The bisphosphonates are drugs with capability to inhibit clastic activity were used in the present study in order to interfere with the bone remodeling induced orthodontic. For this continuous force of 15 cN was applied to the first molars of Wistar male rats of 2 1/2 months, using a biomechanical with superelastic wire. The animals were randomly divided into 4 groups: 1) The control group consisted of eighteen mice, which received sterile saline solution saline for 7 days prior to installation of passive biomechanics, which remained for 3, 10 and 18 days; 2) Eighteen animals were treated with ALN (dose 2.5 mg / kg) for 7 days prior to installation of the passive biomechanical to remain for 3, 10 and 18 days; 3) Eighteen animals were treated with alendronate with the same dose quoted above for 7 days prior to the biomechanical installation that remains active for 3, 10 and 18 days; 4) Eighteen animals were injected with sterile saline solution 7 days prior to the biomechanical installation that remains active for 3, 10 and 18 days. The maxillae were fixed with 4% formaldehyde + 0.1% glutaraldehyde, decalcified in EDTA 4.13% and embedded in paraffin or Spurr resin. The specimens were morphologically analyzed in HE stained sections. Some stained sections were used for immunolabeling for RANKL and OPG. The osteoclasts were marked by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) histochemistry. The ultrathin sections were examined in a transmission electron microscope. Some specimens were frozen in liquid nitrogen for protein extraction and Western Blotting protein expression analyzes. The ALN inhibited bone resorption and root of all the treated groups. The clastic cells present in a latent state. In the orthodontic movement group alveolar bone was remodeled with 18 days to root surface presented itself reabsorbed and the TRAP revealed clasts assets, findings confirmed by transmission electron microscopy. Expression of RANKL activating molecule clastic cells was not inhibited by the

drug. The OPG expression was increased in treated animals. The results demonstrate that the use of alendronate in the orthodontic movement does not interfere with osteoclast recruitment, it apparently inhibits their activation, which can interfere in the bone remodeling process and may reduce the amount of tooth movement.

Keywords: Alendronate. Bisphosphonate. Orthodontic Tooth movement. Osteoclast. Bone Remodeling.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALN	Alendronato de sódio
ALN-CON	Alendronato de sódio sem movimentação ortodôntica
ALN-MOV	Alendronato de sódio com movimentação ortodôntica
BSP	sigla em inglês para <i>bone sialoprotein</i>
Ca ²⁺	íons de cálcio
CEUA/FOUSP	Comitê de ética no uso de animais
CON	Controle
DAB	sigla em inglês para 3.3' <i>diaminobenzidine</i>
OPG	do inglês <i>osteoprotegerin</i>
MOV	movimentação ortodôntica
pH	potencial hidrogênionico
PBS	sigla em inglês para <i>phosphate buffered saline</i>
RANK	sigla em inglês para <i>receptor activator of nuclear factor κB</i>
RANKL	sigla em inglês para <i>receptor activator of nuclear factor κB ligand</i>
TRAP	sigla em inglês para <i>tartrate-resistant acid phosphatase</i>
°C	graus Celsius

LISTA DE SÍMBOLOS

%	sinal matemático de porcentagem
mg	miligrama
ml	mililitro
g	grama
kg	quilograma
μl	microlitro
μm	micrômetros
M	molar
Nm	nanômetros
mM	milimolar
cN	centiNewton

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Periodonto de sustentação.....	19
2.1.1 Cimento.....	19
2.1.2 Ligamento Periodontal.....	21
2.1.3 Tecido Ósseo	21
2.1.3.1 células.....	23
2.1.3.1.1 <i>osteoblasto</i>	23
2.1.3.1.2 <i>osteócito</i>	24
2.1.3.1.3 <i>osteoclasto</i>	24
2.2 Movimentação Ortodôntica	26
2.3 Bisfosfonatos	28
3 PROPOSIÇÃO	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Animais	32
4.2 Tratamento com alendronato sódico	32
4.3 Grupos experimentais	33
4.4 Instalação da biomecânica	34
4.5 Obtenção dos espécimes e fixação	35
4.6 Processamento dos espécimes	36
4.6.1 Microscopia de luz	36
4.6.2 Histoquímica TRAP	36
4.6.3 Reação imunohistoquímica para as proteínas RANKL e OPG	37
4.7 Microscopia eletrônica de transmissão: Morfologia	38
4.8 Western Blotting	39
5 RESULTADOS	41
5.1 Análise histológica e histoquímica TRAP	41
5.1.1 Grupo controle (CON) e grupo alendronato controle (ALN-CON)	41
5.1.2 Grupo movimentação ortodôntica (ORTO)	41
5.1.2.1 três dias	41
5.1.2.2 dez dias	44

5.1.2.3 dezoito dias	47
5.1.3 Grupo movimentação ortodôntica tratado com alendronato (ALN-MOV).....	49
5.1.3.1 três dias	49
5.1.3.2 dez dias	50
5.1.3.3 dezoito dias	52
5.2 Imunohistoquímica para RANKL e OPG	54
5.3 Análise ultraestrutural	59
5.3.1 Grupo controle (CON) e grupo alendronato controle (ALN-CON).....	59
5.3.2 Grupo movimentação ortodôntica (MOV)	60
5.3.3 Grupo movimentação ortodôntica tratado com alendronato (ALN-MOV)	60
5.4 Western Blotting	63
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXO.....	79

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento das reações teciduais é de extrema importância e essencial para o entendimento da movimentação dentária ortodôntica e para o aperfeiçoamento dos tratamentos ortodônticos. Com esse intuito, vários estudos histológicos e moleculares vêm sendo realizados sobre este fundamental aspecto no movimento dentário ortodôntico.

A movimentação ortodôntica ocorre basicamente devido a dois processos, a reabsorção e a neoformação óssea, os quais acontecem nas áreas de pressão e tensão respectivamente. Isso é possível porque o osso é um tecido dinâmico que está em constante remodelação, processo complexo que requer interações entre diferentes tipos celulares (osteoclastos e osteoblastos) que são reguladas por fatores bioquímicos ou fatores mecânicos (por exemplo a movimentação ortodôntica).

Os osteoclastos são as células responsáveis pela reabsorção do osso alveolar. Essas células se formam quando os precursores mononucleares são atraídos para uma superfície mineralizada, se fundem e aderem sobre ela, exercendo assim sua atividade de reabsorção. O principal sistema regulador da osteoclastogênese é o RANK/RANKL/OPG. O RANK (*receptor activator of NFkB*) está presente na membrana plasmática de células precursoras e também em osteoclastos diferenciados. Este receptor sinaliza a proliferação e fusão de precursores e ativa a função reabsortiva dos osteoclastos, o que é dependente do seu acoplamento com o seu ligante, o RANKL (*receptor activator of NFkB ligant*) (Udagawa et al., 1999). O RANKL é expresso na membrana ou secretado por células indiferenciadas, células de revestimento ósseo e osteoblastos. A OPG (osteoprotegerina) é também produzida por células indiferenciadas e osteoblastos (Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2009) e tem afinidade pelo RANKL. Quando a OPG se liga ao RANKL, impede a fusão e ativação dos osteoclastos (Tanaka et al., 2003; Bradaschia-Correa et al., 2013).

Evidências (Kim et al., 1999; Nishijima et al., 2006; Dunn et al., 2007) indicam um papel do RANK/RANKL e OPG na ativação dos osteoclastos

durante o movimento dentário ortodôntico. Como a função de osteoclastos é regulada pela interação com células do ligamento periodontal também é importante observar a expressão de RANKL em células do ligamento periodontal.

Os bisfosfonatos são fármacos reconhecidamente capazes de interferir no metabolismo de osteoclastos, inibindo a reabsorção óssea. Os bisfosfonatos são análogos ao pirofosfato endógeno, que é regulador fisiológico de calcificação. Estes fármacos se ligam à hidroxiapatita da superfície óssea e, uma vez internalizados pelos osteoclastos ao degradarem a matriz óssea, causam um efeito inibitório nessas células (Russell, 2011). O mecanismo inibitório sobre estas células ainda não foi totalmente elucidado. O mecanismo de ação dos diferentes tipos de bisfosfonatos e a potência antireabsortiva estão vinculados à composição de suas cadeias laterais; estes podem apresentar radical hidroxila na sua composição ou átomo de cloro. Os bisfosfonatos podem ser nitrogenados e não nitrogenados: os chamados não- nitrogenados, como o etidronato e o clodronato apresentam baixa potencia antireabsortiva; já os nitrogenados como o pamidronato e o alendronato, apresentam grande aumento na potência antireabsortiva, por possuírem átomo de nitrogênio em sua molécula (Russell, 2011).

Atualmente o bisfosfonato mais utilizado é o alendronato sódico. Este fármaco tem despertado, cada vez mais, o interesse de profissionais da odontologia, devido aos numerosos relatos de complicações pós operatórias, tais como osteomielites, osteonecrose (Yamamoto-Silva et al., 2013), alterações no processo de osseointegração de implantes e na movimentação ortodôntica (Adachi et al., 1994; Krieger et al., 2013) .

Diante das evidências presentes na literatura, dos estudos relacionados ao emprego de bisfosfonatos antes e/ou durante a movimentação dentária ortodôntica (Karras et al., 2006; Fujimura et al., 2009) ainda faz-se necessária uma análise detalhada do efeito destes fármacos no curso da movimentação dentária, especialmente dos aspectos estruturais e ultraestruturais, bem como da presença de moléculas sinalizadoras da osteoclastogênese. Para tanto, foi utilizado um modelo animal em ratos no qual será realizada a movimentação dentária ortodôntica nos 1º molares superiores de ratos tratados e não tratados

com alendronato e avaliadas as respostas do periodonto de sustentação utilizando o modelo descrito anteriormente em ratos (Bonafe-Oliveira et al., 2003) a ultra-estrutura e a imunomarcação de RANKL e OPG nas estruturas periodontais, além da análise da expressão destas proteínas no osso alveolar vestibular pelo método Western Blotting.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Antes de abordar a movimentação dentária ortodôntica, será feita uma breve revisão sobre os tecidos envolvidos neste processo, a saber periodonto de sustentação (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar).

2.1 Periodonto de sustentação

A movimentação dentária ocorre devido à participação direta do periodonto de sustentação, que é constituído pelo cimento, ligamento periodontal e osso alveolar. Os componentes do periodonto de sustentação possuem a mesma origem embriológica, a partir de células ectomesenquimais do folículo dentário. Os três tecidos formam-se simultaneamente e sua associação, uma vez formados, é responsável pela manutenção do dente em seu respectivo alvéolo.

2.1.1 Cimento

É um tecido conjuntivo mineralizado que recobre a dentina radicular e no qual se inserem fibras colágenas do ligamento periodontal. O cimento se desenvolve a partir do folículo dentário, uma estrutura que não faz parte do germe dentário propriamente dito (órgão do esmalte e papila dentária), não sendo, portanto, uma estrutura dentária, apesar de ser depositado sobre a dentina da raiz e de aderir-se firmemente a esse tecido (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

A composição do cimento é muito semelhante à do tecido ósseo, possui aproximadamente 60% de mineral sob a forma de hidroxiapatita, e matriz orgânica constituída por colágeno do tipo I principalmente, e por proteínas não

colágenas como osteopontina, sialoproteína óssea, osteonectina, proteínas de adesão cementária entre outras (Grzesik; Narayanan, 2002).

As células do cimento, cementoblasto e cementócitos, também são muito semelhantes às do tecido ósseo; a grande diferença entre esses tecidos é que o cimento é um tecido avascular e sem inervação (Thilander et al., 2005), e recebe nutrição por difusão do ligamento periodontal (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

Na borda do cimento mineralizado existe uma camada de matriz orgânica não mineralizada chamada cementóide, junto a qual estão presentes cementoblastos. Os cementoblastos são as células que sintetizam a matriz orgânica de natureza intrínseca do cimento. Os cementoblastos ativos apresentam características comuns às células que sintetizam e secretam proteínas. Os cementoblastos que ficaram aprisionados na matriz do cimento durante sua formação são os cementócitos, células muito semelhantes aos osteócitos.

O cimento não sofre remodelação constantemente, diferente do tecido ósseo, por isso células clásticas não são geralmente vistas nessa região, porém, sob estímulo como movimentação ortodôntica, esse tecido pode ser reabsorvido (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

Existem dois tipos de cimento, o cimento acelular, que é encontrado no terço cervical dos dentes, cuja principal função é inserir as fibras do ligamento periodontal, que nessa região são chamadas de fibras de Sharpey; e o cimento celular que contém lacunas com cementócitos e seus prolongamentos e que pode ser composto de fibras mistas. A partir do terço médio da raiz e nas regiões de furca está presente o cimento celular de fibras mistas. As fibras de Sharpey no cimento celular não são completamente mineralizadas. O cimento celular de fibras intrínsecas se forma após o desenvolvimento de todos os tecidos periodontais, por isso é constituído por matriz liberada apenas pelos cementoblastos; é formado em casos de reparação (Nanci; Bosshardt, 2006; Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

2.1.2 Ligamento Periodontal

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado e celular, localizado entre o cemento e o osso alveolar, com a função de articular o dente com seu alvéolo e de absorver pressões mastigatórias (Katchburian; Arana-Chavez 2012).

O ligamento periodontal possui diferentes tipos celulares. São encontrados fibroblastos, células indiferenciadas, restos epiteliais de Malassez (Beertsen et al., 2000), monócitos e macrófagos (Nanci; Bosshardt, 2006) além de osteoblastos, células clásticas e cementoblastos na interface com o osso alveolar e cemento, respectivamente.

Os fibroblastos são as células mais abundantes do ligamento periodontal, responsáveis pela formação do colágeno, apresentam forma alongada e fusiforme, com núcleo ovóide, retículo endoplasmático granular e complexo de Golgi muito desenvolvidos, bem como numerosos grânulos de secreção. Por estarem envolvidos na formação e destruição das fibras colágenas apresentam vacúolos citoplasmáticos contendo fragmentos de fibrilas colágenas e enzimas hidrolíticas (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

As células indiferenciadas são células ectomesenquimais que permitem a diferenciação em novas células de natureza conjuntiva quando necessário. Sugere-se que essas células continuem como precursores dos fibroblastos, cementoblastos e osteoblastos quando o dente já está formado (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

A matriz do ligamento periodontal é constituída por proteínas fibrosas e não fibrosas e por uma substância fundamental. A parte fibrilar do ligamento periodontal tem como componente principal o colágeno do tipo I, no entanto outros tipos de colágeno, como tipo III, V, VI e XII também são encontrados (Beertsen et al., 2000). Fibrilas colágenas com 50 a 70 nm de diâmetro podem estar isoladas ou agrupadas, formando assim as fibras com 0,2 a 0,3 μm , ou ainda, feixes quando encontram-se agrupadas (Bosshardt; Selvig, 1997).

As fibras oxitalânicas que são estruturalmente semelhantes às fibras elásticas, são constituídas por fibrilas com 25nm de espessura que se distribuem entre as fibras colágenas e são encontradas adjacentes aos vasos sanguíneos (Nanci; Bosshardt, 2006).

Embora o ligamento periodontal seja rico em colágeno, cerca de 60% do volume total é composto por substância fundamental, que é constituída principalmente por proteoglicanos, glicosaminoglicanos, glicoproteínas e alguns lipídeos associados, além de grande quantidade de água, a qual se acredita ter um papel na resistência e suporte das forças aplicadas sobre o dente no ligamento periodontal (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

Além da função de suporte, absorção de forças e do seu papel sensorial, o ligamento periodontal atua como remodelador, fornecendo células capazes de formar e reabsorver todos os tecidos que formam, ou seja, osso, cemento e ligamento. Assim, células ectomesenquimais indiferenciadas podem se diferenciar em osteoblastos, cementoblastos ou fibroblastos. As células clásticas reabsorvem tanto o tecido ósseo quanto o cemento, sendo que a fagocitose do colágeno é realizada pela célula que o produz, fibroblasto (Lekic; McCulloch, 1996).

2.1.3 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo cuja matriz extracelular é mineralizada, característica esta que lhe confere rigidez e resistência. O osso alveolar é uma das estruturas que apresenta as mesmas características do tecido ósseo das demais regiões do organismo, e será abordado no presente estudo.

2.1.3.1 células

Existem no tecido ósseo células formadoras e degradadoras de matriz. As células formadoras da matriz óssea orgânica são os osteoblastos, quando a matriz se mineraliza os osteoblastos ficam aprisionados nesta, de onde emitem prolongamentos sendo denominados osteócitos. A matriz formada pelos osteoblastos é degradada pelos osteoclastos. Além disso, há as células que revestem o tecido ósseo e não apresentam atividade secretora e são denominadas células de revestimento ósseo (Hirashita, 1976).

2.1.3.1.1 osteoblasto

Os osteoblastos são células mononucleares que derivam de células mesenquimais indiferenciadas. São células polarizadas sintetizadoras e secretoras de matriz extracelular. Apresentam núcleo arredondado com cromatina frouxa e nucléolo evidente, abundantes cisternas de retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi proeminente e desenvolvido, numerosas vesículas de secreção e lisossomos.

Quando em estado quiescente, os osteoblastos tornam-se achatados, inativos e são denominados células de revestimento ósseo ou *bone lining cells* (Hirashita, 1976). No entanto, os osteoblastos podem voltar a sintetizar e secretar matriz quando houver necessidade de formação de novo tecido ósseo.

Os osteoblastos e células de revestimento ósseo podem apresentar moléculas em sua membrana plasmática, ou secretá-las, o RANKL e a OPG, que atuam como ativadores e inibidores, respectivamente, da atividade de osteoclastos (Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2009).

2.1.3.1.2 *osteócito*

Durante o processo de mineralização do osteóide alguns osteoblastos ficam aprisionados no interior desse matriz. Essas células são chamadas de osteócitos e são as células mais abundantes do tecido ósseo (Franz-Odenndal, 2006). Ficam alojadas em lacunas no interior da matriz óssea que possuem numerosos prolongamentos com aspecto dendrítico que ocupam os canálculos que partem das lacunas. Os prolongamentos de cada osteócito se encontram com prolongamentos de osteócitos vizinhos e estabelecem junções comunicantes entre si. O fluido canalicular preenche o espaço entre osteócitos e suas lacunas, e sua difusão pelo sistema lacuno-canalicular garante a distribuição de nutrientes para o interior da matriz óssea (Bonewald, 2011).

Apesar dos osteócitos apresentarem característica como citoplasma com poucas cisternas de retículo endoplasmático rugoso e sáculos de complexo de Golgi, sua atividade é indispensável para manutenção da homeostase óssea óssea (Katchburian; Arana-Chavez, 2012).

2.1.3.1.3 *osteoclasto*

Os osteoclastos são células móveis, multinucleadas, formadas a partir de células mononucleares derivadas do tecido hematopoiético que sob estímulos específicos se fusionam e aderem ao tecido ósseo (Lerner, 2000) sendo responsáveis pela degradação da matriz óssea mineralizada.

O osteoclasto em atividade reabsortiva adere-se à matriz óssea através de estruturas denominadas podossomos. Esta não apenas une o osteoclasto à superfície mineralizada, mas também isola o microambiente entre ele e a superfície do osso, tornando assim um microambiente favorável à reabsorção óssea (Delaisse et al., 2003). Quando examinada em microscopia eletrônica de transmissão, esta região do citoplasma dos osteoclastos apresenta-se livre

de organelas e, devido a este aspecto, é normalmente denominada zona clara. O podossomo delimita os domínios celulares da membrana dos osteoclastos; a porção da membrana contida no interior da zona de selamento é denominada borda em escova. (Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2009).

A membrana plasmática na região da borda em escova apresenta numerosas invaginações que apresenta aspecto pregueado, além dos numerosos vacúolos no citoplasma contribuírem com este aspecto. No microambiente criado pela borda em escova, zona clara e matriz mineralizada, ocorre a acidificação do meio através da ação de uma bomba de prótons ATPase tipo V (vacuolar) (Mulari et al., 2003) iniciando assim a desmineralização da matriz inorgânica. A degradação da matriz orgânica ocorre pela liberação aminoácidos produzidos pela ação de enzimas liberadas, tais como catepsina B (Delaisse et al., 2003), e um tipo especial de fosfatase ácida, a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).

Estas células são originadas em resposta ao recrutamento às superfícies mineralizadas em situações fisiológicas ou patológicas quando há estímulo para a reabsorção óssea. Além da matriz óssea, outros tecidos mineralizados do organismo como a dentina, cimento e esmalte podem ser reabsorvidos por odontoclastos e cementoclastos, razão pela qual são geralmente denominadas células clásticas (Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2009).

O processo de osteoclastogênese envolve o recrutamento de seus precursores hematopoiéticos. O sistema regulador desse processo é o RANK/RANKL/OPG. O RANK (*receptor activator of NFκB*) é um receptor da superfamília de receptores TNF (*tumour necrosis factor*) que está presente na membrana plasmática de células precursoras e nos osteoclastos diferenciados. Este receptor sinaliza a proliferação e fusão de precursores e também ativa a função de reabsorção dos osteoclastos, sendo este um fenômeno dependente do acoplamento com seu ligante o RANKL (*receptor activator of NFκB ligand*) (Udagawa et al., 1999). O RANKL é expresso na membrana e secretado por células mesenquimais osteoprogenitoras, células de revestimento ósseo e osteoblastos (Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2012). A OPG (osteoprotegerina) é uma proteína produzida por células mesenquimais

osteoprogenitoras e osteoblastos (Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2009) considerada outro receptor de RANKL que quando se une ao RANKL impede a fusão e ativação dos osteoclastos (Tanaka et al., 2003; Bradaschia-Correa et al., 2013). A avidéz da ligação da OPG com RANKL é 10 vezes maior do que de RANK para RANKL, assim OPG age para inibir a interação entre RANK e RANKL, suprimindo a diferenciação dos osteoclastos (Shoji et al., 2010). Em camundongos com superexpressão de OPG reduziu-se a reabsorção óssea e houve o desenvolvimento de osteopetrose grave (Simonet et al., 1997). Desta forma, a presença de RANKL e OPG determinam se RANK é ativado.

2.2 Movimentação Ortodôntica

As respostas biológicas decorrentes da movimentação ortodôntica envolvem reações teciduais nos tecidos periodontais, especialmente no periodonto de sustentação. A movimentação ortodôntica ocorre através de dois processos no osso alveolar: reabsorção nas áreas de pressão e formação nas áreas de tração (Reitan, 1951; 1960). Isso é possível porque o osso é um tecido dinâmico que está em constante remodelação. Esse é um processo complexo, que requer interações entre diferentes tipos celulares (osteoclastos e osteoblastos) que são regulados por fatores bioquímicos ou fatores mecânicos (por exemplo, a movimentação ortodôntica).

Nas áreas de pressão, ocorre aumento do número de osteoclastos e conseqüentemente reabsorção óssea. No ligamento periodontal dessas áreas ocorrem alterações na vascularização e fluxo sangüíneo (Rygh, 1972b), além de picnose dos núcleos dos fibroblastos, desorganização das fibras colágenas e hialinização (Rygh, 1972a; 1976) que é uma área necrótica localizada no ligamento periodontal, isenta de elementos celulares e outras estruturas parecendo ser um fator limitante do movimento dentário (Rygh, 1973). A maioria dos estudos indica que a hialinização do ligamento periodontal durante a fase inicial do tratamento ortodôntico é quase inevitável (Reitan, 1973; Rygh, 1977). Na área hialinizada, não há o recrutamento dos precursores de

osteoclastos, e com isso não há fusão e ativação dos osteoclastos, não existindo o movimento ortodôntico até que o tecido seja eliminado (Brudvik; Rygh, 1995). Uma grande variedade de células pode estar envolvida com o processo de eliminação das áreas hialinizadas, como macrófagos, células mononucleadas e osteoclastos (Brudvik; Rygh, 1993). O processo de reparação das áreas hialinizadas se inicia alguns dias após a redução da pressão e as áreas são repopuladas com células normais. A penetração de novos capilares é um fator importante neste processo de reparação (Rygh, 1972b; Faltin et al., 2001).

Com relação às alterações teciduais decorrentes da movimentação ortodôntica na zona de tensão, ocorre aumento acentuado nos espaços entre as estruturas do ligamento periodontal. As células do ligamento periodontal apresentam formato fusiforme e se encontram com seu longo eixo na direção da tração. Os osteoblastos migram e permanecem distribuídos a curta distância da superfície do osso alveolar, o que caracteriza a primeira resposta dessas células frente ao estímulo ortodôntico de tração (Hirashita, 1976). No cemento depositado sobre a superfície radicular, muitas linhas incrementais irregulares são encontradas (Rygh, 1976). A deposição do novo osso ocorre ao longo da superfície do alvéolo progressiva com o aumento de tempo da movimentação (Rygh, 1976).

Evidências indicam um papel do RANK/RANKL e OPG na ativação dos osteoclastos durante o movimento dentário ortodôntico. A função de osteoclastos é regulada pela interação com células do ligamento periodontal, portanto, também é importante observar a expressão de RANKL em células do ligamento periodontal. Shiotani et al. (2001) relataram a presença de RANKL em fibroblastos, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos próximos as lacunas de reabsorção durante a aplicação de forças ortodôntica intermitentes. Kim et al. (2012), utilizando força ortodôntica contínua demonstraram que as células do ligamento periodontal expressam continuamente RANKL, sugerindo que, em resposta ao stress mecânico, RANKL pode ser regulada por citocinas inflamatórias do ligamento periodontal. Estudos recentes sugerem que, pelo menos, em resposta a forças mecânicas, osteócitos podem regular o recrutamento de osteoclastos a locais de reabsorção óssea, induzindo a

expressão de RANKL por células osteoblásticas (Boyce; Xing, 2008).

Em ratos “knock out” para OPG e ratos normais não houve diferença na expressão de RANKL após a aplicação de forças ortodônticas, embora houve grande reabsorção óssea alveolar em animais com deficiência de OPG, apoiando a ideia de que a expressão relativa de RANKL e OPG contribui para a atividade dos osteoclastos (Shoji et al., 2010).

2.3 Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos fazem parte de um grupo de fármacos com propriedades antireabsortiva usados para tratamento de doenças ósseas como osteoporose, doença de Paget, metástases ósseas (Coxon et al., 2006; Russel et al., 2008) e osteogênese imperfeita (Castillo, Samson-Fang, 2015). Eles podem ser divididos em dois grupos (Rogers et al., 2000): os não nitrogenados e os nitrogenados. Essa divisão é baseada na composição de suas cadeias laterais e dela dependem o mecanismo de ação dos diferentes tipos de bisfosfonato, bem como a potência antireabsortiva dos mesmos.

Os chamados não-nitrogenados (ou de primeira geração), como o etidronato e o clodronato, apresentam radical hidroxila (OH) ou um átomo de cloro (Cl) em uma das cadeias laterais e são os de menor potência. Estes bisfosfonatos atuam no metabolismo de ATP dos osteoclastos e resultam em produtos não hidrolisáveis que acumulam em seu citoplasma e, conseqüentemente, inibem várias enzimas, comprometendo a função destas células (Russell, 2011).

Os bisfosfonatos que possuem um radical $-NH_2$ apresentam aumento significativo de sua potência reabsortiva e são denominados bisfosfonatos nitrogenados (ou de segunda geração) (Rogers et al., 2000). O alendronato sódico, risedronato e o ácido zoledrônico são exemplos desse tipo de bisfosfonato. Estes, apresentam grande afinidade por cristais de hidroxiapatita. Seu efeito sobre as células clásticas consiste na inibição da via do mevalonato,

impedindo assim a síntese do colesterol e demais lipídeos, além de evitarem a prenilação de GTPases essenciais em diversas funções celulares como a do citoesqueleto, que é responsável pela formação da borda em escova (Russell, 2006, 2011). Alguns estudos apontam evidências de que a inibição da atividade dos osteoclastos seja mediada por osteoblastos (Vitté et al., 1996).

O uso de bisfosfonatos tem cada vez mais despertado o interesse de profissionais da odontologia, devido aos numerosos relatos de complicações pós operatórias tais como osteomielites, osteonecrose (Yamamoto-Silva et al., 2013), alterações no processo de osseointegração de implantes e na movimentação dentária.

Diversos estudos investigaram a influência dos bisfosfonatos na movimentação ortodôntica em modelos animais (Kaipatur et al., 2013; Karras et al., 2009; Fugimura et al., 2009) e todos eles concluíram que a movimentação dentária ortodôntica é reduzida após a administração de bisfosfonato. Além disso, outros autores também indicaram uma melhora no efeito de ancoragem (Krieger et al., 2013; Ortega et al., 2012).

Estudos realizados em ratos tratados com o alendronato sódico, administrado pelo método de gavagem antes e durante a movimentação dentária ortodôntica, demonstraram ocorrer uma diminuição da quantidade de movimentação ortodôntica de 75% em 2 semanas e 58% em 4 semanas comparados com o grupo controle (Karras et al., 2009). A administração de alendronato sódico subcutâneo em ratos previamente e durante o tratamento ortodôntico também foi realizada por Kaipatur et al. (2013) e os resultados indicaram um efeito inibitório na movimentação dentária. Pesquisas sobre movimentação ortodôntica em ratos tratados com risedronato mostraram que a diminuição da movimentação é dependente da dose injetada, e que o número de osteoclastos é significativamente menor nos grupos tratados (Adachi et al. 1994). Além disso, a estrutura dos osteoclastos encontra-se modificada com redução na expressão vacuolar H⁺ ATPase e catepsina K (Sato et al., 2000).

Estudo *in vitro* realizado com células humanas, relatou uma diminuição no estresse mecânico sobre o ligamento periodontal, refletida na baixa de prostaglandina E2 e níveis de ciclooxigenase 2 e os níveis de ácido ribonucléico mensageiro do receptor ativador do fator nuclear kappa B ligante,

o que poderia levar a uma redução da quantidade de movimentação ortodôntica (Liu et al., 2006).

No presente estudo, buscamos induzir alterações no processo de reabsorção óssea por osteoclastos através da administração de alendronato sódico em ratos com dois meses e meio de vida e interferir na movimentação dentária ortodôntica. Foram analisados os primeiros molares superiores utilizando diferentes abordagens, analisando aspectos imunocitoquímicos do tecido ósseo e biomoleculares pela análise das moléculas reguladoras da osteoclastogênese RANKL e OPG.

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito do alendronato sódico no mecanismo de reabsorção óssea durante a movimentação ortodôntica em ratos. Dessa forma, foram analisados os seguintes aspectos:

1. Análise morfológica e ultraestrutural do periodonto de sustentação em áreas de pressão.
2. Presença e atividade das células clásticas nas superfícies dos tecidos mineralizados.
3. Imunolocalização das proteínas RANKL e OPG no osso alveolar.
4. Semi-quantificação das proteínas reguladoras da atividade de osteoclasto RANKL na tábua óssea vestibular por Western Blotting.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia será descrita a seguir.

4.1 Animais

A presente pesquisa foi conduzida de acordo com os princípios éticos de uso de animais em pesquisa. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, (Protocolo nº 013/2013). (Anexo A)

No presente estudo foram utilizados 80 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) albinos, machos, com dois meses e meio de idade (peso aproximado 200-210 gramas) provenientes do Laboratório de Biologia Oral da Universidade de São Paulo. Destes, 8 foram perdidos durante o trabalho porque haviam removido parte da biomecânica ortodôntica e não fizeram parte do estudo.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, sob condições ambientais controladas de temperatura (23°C), de luminosidade (12 horas de claro e 12 horas de escuro), e acesso a água e ração em pó.

4.2 Tratamento com alendronato sódico

O tratamento dos animais com alendronato sódico ou apenas com o veículo foi realizado diariamente por 7 dias antes da instalação da biomecânica ortodôntica.

As doses utilizadas nos tratamentos foram 2,5 mg/kg de alendronato de sódio (Bradaschia-Correa et al., 2007). A massa corpórea dos animais foi aferida no primeiro dia de injeção nos animais em balança digital e as soluções de alendronato foram preparadas utilizando tampão PBS como veículo. Foi

injetado subcutaneamente no dorso dos animais um volume de 10 μ L de solução. Nos animais controles, foi injetado o mesmo volume de solução salina.

4.3 Grupos experimentais

Os animais utilizados no presente estudo foram divididos em 4 grupos conforme descrito abaixo e resumido na tabela 4.1:

- 1) CON: O grupo controle foi formado por dezoito ratos nos quais foram injetada solução salina por 7 dias antes da biomecânica passiva ser instalada, e que permaneceu por 3, 10 e 18 dias.
- 2) MOV: Dezoito animais foram injetados com solução salina por 7 dias antes da biomecânica ativa ser instalada que permaneceu por 3, 10 e 18 dias.
- 3) ALN-MOV: Dezoito animais foram tratados com alendronato por 7 dias antes da instalação da biomecânica ativa que permaneceu por 3, 10 e 18 dias.
- 4) ALN-CON: Dezoito animais foram tratados com alendronato e tiveram a instalação da biomecânica passiva que permaneceu por 3, 10 e 18 dias.

Tabela 4.1- Divisão dos grupos experimentais

	Biomecânica passiva, solução salina (CON)	Biomecânica ativa, alendronato (MOV)	Biomecânica ativa, alendronato (ALN- MOV)	Biomecânica passiva, solução salina (ALN-CON)
3 DIAS	6	6	6	6
10 DIAS	6	6	6	6
18 DIAS	6	6	6	6

4.4 Instalação da Biomecânica

A biomecânica utilizada para promover movimento de vestibularização dos primeiros molares superiores (direito e esquerdo) gerando uma força contínua de 15cN/mm foi instalada sob anestesia geral. Para tanto, os animais foram anestesiados com 1ml/Kg de cloridrato de xilazina (Anasedan) e 1ml/kg cloridrato de ketamina (Donaren ®) via intramuscular. A ancoragem do aparelho foi instalada nos incisivos, enquanto a parte ativa foi fixada com resina composta (Transbond XT – 3M) na face palatina dos primeiros molares superiores. O modelo biomecânico utilizou uma ancoragem anterior, estabilizando o aparelho com o intuito de evitar possíveis contatos diretos provenientes da mastigação, os quais poderiam influenciar na força aplicada. Para obtenção da ancoragem anterior junto aos incisivos superiores anteriores, utilizou-se um fio de aço 0,5mm (Federhart, Dentaureum), o qual foi submetido à solda-prata (45%), unindo-o a um tubo de .018"x .025", através do qual, foi inserida a porção ativa do aparelho, composta de fio ortodôntico .016" (0,40mm), de Ni-Ti-SE, (Forestadent, Bernhard Förster GmbH, Pforzheim/Germany), consistindo em fios superelásticos calibrados individualmente na Universidade de Ulm, Alemanha (Wichelhaus; Sander, 1995). Para uma melhor fixação da parte ativa nos dentes que foram submetidos aos estímulos ortodônticos utilizou-se braquetes de aço (0,8x0,8mm) com slot compatível ao diâmetro do fio, que foram fixados com resina composta (Transbond XT – 3M) na face palatina dos 1º molares superiores. Em seguida, o fio ortodôntico foi fixado no slot do braquete com a mesma resina composta (Figura 4.1).

Nos casos de biomecânica passiva, o anel de ancoragem e os braquetes foram instalados, somente o fio é que não foi colocado, sendo assim não ocorreu movimentação dentária ortodôntica.

Figura 4.1 – Biomecânica instalada para promover movimento de vestibularização

4.5 Obtenção dos espécimes e fixação

As maxilas foram retiradas dos animais e imediatamente imersas em uma solução fixadora contendo glutaraldeído a 0,1% + formaldeído a 4% (preparado do paraformaldeído) para microscopia de luz, imuno-histoquímica e microscopia eletrônica de transmissão, na qual foram submetidos à irradiação de microondas em forno de laboratório Pelco 3440 (Ted Pella, Redding, C.A. USA), a uma temperatura máxima de 37°C (Massa et al., 2006). O material foi exposto a 3 ciclos de 5 minutos a 100% de potência. Em seguida esse material

foi imerso em nova solução fixadora e permaneceu overnight a 4°C (Massa, Arana-Chavez, 2000).

4.6 Processamento dos espécimes

Após a fixação, os espécimes foram lavados durante 1 hora em tampão cacodilato de sódio a 0,05M pH 7,2 e em seguida imersos em solução de EDTA a 4,13%, pH 7,2 onde permaneceram por aproximadamente trinta dias para descalcificação (Warshawsky; Moore, 1967).

4.6.1 Microscopia de luz

As maxilas foram separadas e somente o 1º Molar utilizado para esse experimento. As amostras foram lavadas em tampão cacodilato diluído por 6 ciclos de 10 minutos. Em seguida, o material foi desidratado em sequência crescente de etanol, clareados em xilol, infiltrados e incluídos em parafina através do sistema LEICA EG 1160. Cortes de 4µm feitos no micrótomo Microm HM 360 e posteriormente corados em hematoxilina e eosina para análise histológica. As imagens foram obtidas em um microscópio Olympus BX-60 equipado com sistema de captura de imagem Cell F.

4.6.2 Histoquímica TRAP

Parte dos cortes foi submetida à histoquímica TRAP com o objetivo de identificar células clásticas e seus precursores. Cortes de 4µm desparafinizados em 2 banhos de xilol por 30 minutos, e hidratados em concentrações decrescentes de etanol. Em seguida foram incubados no meio de Burstone que foi preparada dissolvendo-se 4 mg de “naphotol AS-BI

phosphate substrate” em 0,25 ml de N,N–dimetil-formamida, adicionando 25 mL de tampão acetato 0,2M pH5,0, 35mg de Fast Red Violet LB ou Fast Garner GBC, e 2 gotas de MgCl a 10%. Em seguida, 25 mL de solução em jarra Coplin foi filtrada e aquecida a 37°C, e à mesma adicionado D(-) ácido tartárico 50 mM. As lâminas foram incubadas por 2h. Depois da incubação, as lâminas foram desidratados com etanol em uma sequência crescente de 70% à 100%, diafanização em xilol e depois lavadas em água corrente. Todas as lâminas foram contra-coradas com solução alcoólica de hematoxilina de Harris a 3% por 3 minutos. Após a contra-coloração, realizou-se a desidratação dos cortes em concentrações crescentes de etanol, seguida de etanol/xilol e diafanização em xilol. Todas as lâminas contendo os cortes foram cobertas com lamínula utilizando Entellan e observadas em microscópio de luz Olympus BX-60.

4.6.3 Reação Imuno-histquímica para as proteínas RANKL e OPG

Os cortes de 4µm foram coletados sobre lâminas de vidro previamente silanizadas pela solução de 3-aminopropytriethoxy-silane (Sigma Chemical CO, St Louis, Mo/USA) a 20% em álcool absoluto e foram desparafinizados em dois banhos de xilol, um a 60°C por 15 minutos, e outro em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguido por etanol 95% e 85% durante 5 minutos cada. Com a finalidade de se remover o pigmento do fixador, os cortes foram imersos em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica a 95% durante 10 minutos.

Posteriormente, foram lavados em água corrente por 10 minutos e passados por dois banhos de água destilada de 5 minutos cada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com dois banhos de quinze minutos cada um em solução peróxido de hidrogênio a 6% e metanol (1:1v/v). Os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos e, posteriormente, imersos em dois banhos de solução de Tris pH 7,4, por cinco minutos cada.

Os cortes foram incubados durante 60 minutos em soro suíno (Sigma) para posteriormente serem incubados durante 18 horas com os anticorpos. Para identificação da proteína osteoprotegerina foi utilizado o anticorpo anti-osteoprotegerina (Santa Cruz Biotechnology- SC 11383) na concentração de 1:150, para identificação da RANK L foi utilizado o anticorpo cabra anti-rankl (Santa Cruz Biotechnology – SC 7627) na concentração de 1:75.

Após o tempo de incubação do anticorpo primário os cortes foram imersos em solução Tris. Em seguida foi feita a incubação do complexo estreptavidina-biotina (Kit LSAB Peroxidase K0690- Dako North American Carpinteria, CA, USA) por 30 minutos em ambiente escuro e câmara úmida, após a aplicação de cada reagente os cortes passaram novamente pela solução Tris.

Para revelação, foi utilizado o cromógeno diaminobenzidina 0,025% (DAB, 3,3-diaminobenzidina, Dako, Carpinteria, CA, USA) seguindo as orientações do fabricante. Após a lavagem, os cortes foram contra corados com hematoxilina de Mayer previamente filtrada por 10 minutos.

Finalizada a coloração, os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol seguindo a seqüência de 70%, 75% e 80% somente passagem; 85%, 90%, 95% e 100% durante 3 minutos cada banho e diafanização em xilol por 3 minutos. As lâminas foram montadas em Entellan (EMS, Hatfield, PA, USA) e examinadas em um microscópio de luz Olympus BX-60.

4.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão: Morfologia

Dois ratos dos grupos MOV e ALN-MOV de 3 e 18 dias foram destinados para a análise ultra-estrutural. Após a descalcificação, as regiões contendo os primeiros molares movimentados foram cortadas com uma navalha. Os espécimes foram lavados extensivamente em uma solução tampão de cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7.2. Os espécimes foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% por duas horas, à temperatura ambiente. Todas as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool e infiltradas em resina Spurr.

Cortes semifinos no sentido vestibulo palatino, de 1 μm de espessura e corados com azul de toluidina foram examinados em microscópio de luz. Regiões contendo as raízes dos primeiros molares movimentados foram selecionadas para posteriores cortes ultrafinos de 60 nm de espessura, os quais foram obtidos com uma faca de diamante em um ultramicrotomo Leica Ultracut R. Os cortes ultrafinos foram coletados em telas de cobre de 200 “meshes” e foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1010 equipado com dispositivo de captura de imagem digital, Gatan, com câmera SC 1000 Orius acoplada.

4.8 Western Blotting

Para a realização do Western Blotting foram coletadas amostras da parede vestibular do osso alveolar do 1º Molar superior. Esse tecido foi imediatamente congelado por imersão em nitrogênio líquido até o momento da extração das proteínas. Antes da extração de proteínas os fragmentos ósseos foram triturados até se reduzirem a pó sob refrigeração. Em seguida foram transferidos para um gral de porcelana onde foram adicionados 10 μL de inibidor de protease e 1 mL de tampão de lise contendo KCL a 100 mM + Hepes a 10 mM + MgCl a 3 mM + EDTA a 5 mM + DTT a 1 mM + SDS a 10% e glicerol a 10% e macerados lentamente até a obtenção de um líquido homogêneo. O lisado em seguida foi centrifugado a 10000 rpm a 4 °C durante 10 minutos e o sobrenadante obtido aliquoteado e estocado a -80 °C.

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

As alíquotas do sobrenadante foram misturadas com tampão de amostra para concentração final de 1X, contendo 20 μg de proteína total. Em seguida, foram aquecidas a 100°C durante 5 minutos e então submetidas a SDS-PAGE, sendo feita eletroforese a 100 V por 100 minutos, em gel de acrilamida a 10%. O padrão de peso molecular utilizado foi o Full range Rainbow® (Amersham

Pharmacia Biotech, Aylesbury, UK).

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi feita por eletrotransferência semi-seca, utilizando um tampão de transferência (250 mM Tris-Base; 1,92 mM Glicina, 20 % Metanol; pH 8,3). A transferência foi realizada com 50V por 150 minutos.

Para a imunoreação, foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos com 5% de leite desnatando em TTBS (tampão TRIS com adição de Tween a 0,01%) por 1 hora em temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a solução de bloqueio foi removida lavando a membrana com TTBS. A membrana foi incubada *overnight* à temperatura ambiente e sob agitação com anticorpo *rabbit anti-RANKL*. Foram feitas duas lavagens com TTBS para a remoção do anticorpo não absorvido e duas lavagens com TTBS sob agitação à temperatura ambiente, seguindo de incubação por 1 horas com anticorpo secundário diluído em solução de bloqueio. A imunoreatividade foi avaliada através de um kit próprio.

5 RESULTADOS

Os resultados serão descritos a seguir.

5.1 Análise histológica e histoquímica TRAP

5.1.1 Grupo controle (CON) e grupo alendronato controle (ALN-CON)

Os grupos controle (CON) e alendronato controle (ALN-CON) apresentaram aspectos normais do periodonto de sustentação com a superfície do cimento lisa e contínua, assim como do osso alveolar. O ligamento periodontal apresentou-se sem alterações, com feixes de colágenos e fibroblastos intactos (Figura 5.1). As células clásticas foram evidenciadas através do método de histoquímica para TRAP, os cortes dos grupos CON apresentaram essas células multinucleadas, exercendo reabsorção fisiológica de algumas regiões do tecido ósseo (Figura 5.2 A). O grupo ALN-CON apresentou as células clásticas em estado latente arredondadas (Figura 5.2 B).

5.1.2 Grupo movimentação ortodôntica (MOV)

Análise histológica e histoquímica para os grupos nos quais foi realizada a movimentação ortodôntica.

5.1.2.1 três dias

Nos cortes histológicos de todos os animais desse grupo observou-se a presença de osteoclastos ativos aderidos ao osso alveolar reabsorvendo matriz mineralizada, evidenciados através do método de histoquímica para TRAP

(Figura 5.3 B). A superfície do cimento apresentou-se lisa sem sinais de reabsorção. O ligamento periodontal dessas regiões apresentou-se com feixes de colágeno intactos e fibroblastos com sua forma alongada e fusiforme (Figura 5.3 A).

Figura 5.1- Fotomicrografias mostrando, em A e B, o periodonto de sustentação dos grupos CON e ALN-CON respectivamente. Ambos apresentam aspecto de normalidade constituído por osso alveolar (OA), ligamento periodontal (LP), cimento (Cem) e dentina (D). A, 100x; B, 100X

Figura 5.2 - Fotomicrografias mostrando histoquímica para TRAP dos grupos CON e ALN-CON respectivamente. Em A, osso alveolar (OA) onde são observados osteoclastos ativos (Oc) aderidos ao trabeculado do osso. Em B, osteoclasto latente (OcL) distante da superfície óssea. A, 200X; B, 400X

Figura 5.3 - Fotomicrografias do grupo 3 dias MOV. Em A, mostrando osso alveolar (OA), ligamento periodontal (LP) e dentina (D). Notar a superfície íntegra do cimento e a presença de osteoclasto (Oc) sobre a superfície alveolar. Em B, osteoclastos ativos adjacentes a lacunas de Howship (LH). A, 200x; B, 400x

5.1.2.2 dez dias

A partir dos cortes histológicos foi possível observar alguns osteoclastos distantes da superfície alveolar, embora a presença de osteoclastos ativos aderidos ao osso alveolar reabsorvendo matriz mineralizada tenha sido predominante (Figura 5.4 A). Linhas mais coradas caracterizaram prováveis

linhas cimentantes. A coloração acentuada na superfície alveolar, observada nas lacunas previamente reabsorvidas, assemelhou-se a tais linhas encontradas no interior da matriz do tecido ósseo (Figura 5.4 B e C).

Áreas hialinizadas com aspecto homogêneo foram comuns no ligamento periodontal; no entanto, a hialinização não atingiu todo o ligamento periodontal, encontrando-se também áreas com aspecto normal com fibrilas intactas e fibroblastos sem sinais de degeneração (Figura 5.4 A). Apesar da intensidade da reação, o cimento permaneceu intacto.

Figura 5.4 - Fotomicrografias do grupo de 10 dias MOV. Em A, osso alveolar (OA) e osteoclastos ativos (Oc). No ligamento periodontal (LP) presença de área hialinizada (H). Cimento (Cem) intacto. Em B, osteoclasto ativo (Oc) aderido ao osso logo abaixo de uma área hialinizada (H). Em C, osteoclastos TRAP positivos (Oc) aderidos à superfície óssea. A, 200X; B, 200X; C, 180X.

5.1.2.3 dezoito dias

Como já foi citado nos tempos anteriores no osso alveolar houve predomínio de reabsorção óssea, com a presença de osteoclastos ativos aderidos a superfície óssea formando lacunas de Howship. Tais concavidades apresentavam células mononucleares nas proximidades (Figura 5.5 A e C).

A hialinização foi um processo muito severo encontrado em diversas regiões do ligamento periodontal e consistiu em um processo degenerativo das células do ligamento periodontal. Estas áreas foram mais extensas do que no grupo de dez dias. (Figura 5.5 A e D) Abaixo dessas áreas foi possível observar reabsorção radicular que atingiu o cimento e a dentina (Figura 5.5 D).

Com a manutenção da força por dezoito dias algumas regiões da raiz apresentaram-se reabsorvidas. A reabsorção nesse período foi tão intensa que atingiu a dentina, e ocorreu tanto em áreas abaixo a hialinização quanto em áreas com ligamento periodontal intacto (Figura 5.5 C e D). Clastos ativos foram encontrados aderidos à dentina (Figura 5.5 C). No entanto, em algumas dessas áreas foi possível observar o início da reparação com a presença de cementoblastos ativos sob as lacunas previamente reabsorvidas (Figura 5.5 B e D).

Figura 5.5 - Fotomicrografias do grupo de 18 dias MOV. Em A, osso alveolar (OA), com ligamento periodontal adjacente, apresentando área hialinizada (H). Em B, ligamento periodontal (LP) e parte do cimento (Cem) e dentina (D) reabsorvidos e a presença de cementoblastos (cb) adjacentes. Em C, osteoclastos (Oc) e células clásticas (cc) TRAP-positivas são observadas reabsorvendo ao osso e dentina (D) respectivamente. RR, reabsorção radicular; setas, lacunas de Howship. Em D, reabsorção radicular atingindo dentina (D) logo abaixo de uma área hialinizada (H). Notar a presença de cementoblastos (cb) adjacentes. A, 200x, B, 400x, C, 100x; D, 200x

5.1.3 Grupo movimentação ortodôntica tratado com alendronato sódico (ALN-MOV)

Serão apresentados os resultados para o grupo de animais que foi injetado ALN e foi realizada a movimentação ortodôntica.

5.1.3.1 três dias

A presença de células clásticas em sua maioria, estavam em estado latente com forma arredondada distantes da superfície óssea onde não foram vistas lacunas de Howship (Figura 5.6 A). Os clastos latentes foram evidenciados pela técnica histoquímica TRAP (Figura 5.6 B).

O ligamento periodontal apresentou algumas pequenas áreas de hialinização entre o osso alveolar e a superfície radicular. Cimento e dentina encontraram-se com seu aspecto de normalidade sem nenhuma alteração (Figura 5.6 A).

Figura 5.6 - Fotomicrografias do grupo 3 dias ALN-MOV. Em A, parte do periodonto de sustentação com osso alveolar (OA), ligamento periodontal apresentando área hialinizada (H) e dentina sem sinais de reabsorção. Osteoclasto (OcL) com formato arredondado próximo porém não aderido à superfície óssea. Em B, osteoclastos (OcL) TRAP-positivos com aspecto latente, afastados da superfície óssea. A, 200X; B, 200X

5.1.3.2 dez dias

As áreas de hialinização no ligamento periodontal nos animais tratados com alendronato aumentaram significativamente tanto em volume quanto em sua localização quando comparadas com os grupos do mesmo período apenas com a movimentação ortodôntica. Essas áreas foram encontradas no ligamento periodontal entre osso alveolar cemento (Figura 5.7 A) e ligamento periodontal e osso interradicular próximo a furca (Figura 5.7 C). No entanto, foi possível observar áreas do ligamento periodontal que se apresentavam sem alterações (Figura 5.7 B). Os osteoclastos TRAP- positivos continuaram apresentando o mesmo aspecto descrito anteriormente em estado latente (Figura 5.7 C e D). O cimento e a dentina não foram reabsorvidos.

Figura 5.7 - Fotomicrografias do grupo 10 dias ALN-MOV. Mostrando em A, área de hialinização (H) no ligamento periodontal. Observa-se também dentina (D) sem sinais de reabsorção. Em B, parte do ligamento periodontal (LP) sem alterações, osteoclastos (Ocl) arredondados distantes do osso alveolar (OA). Em C, fotomicrografia da histoquímica TRAP alguns osteoclastos multinucleados próximos ao osso interradicular (OI) e área hialinizada (H) ligamento periodontal entre osso interradicular (OI) e furca. Em D, células clásticas (cc) TRAP positivas em estado latente próximas a superfície do osso (OA) e cimento (Cem). A, 100X; B, 100X; C, 80X; D, 100X.

5.1.3.3 dezoito dias

Nesse período experimental as áreas hialinizadas aumentaram ainda mais em volume e sua localização continuou acontecendo no ligamento periodontal entre o osso alveolar e a superfície radicular (Figura 5.8 A), e no osso interradicular entre as superfícies radiculares (Figura 5.8 B). Apesar da intensidade da reação, o cimento permaneceu intacto (Figura 5.8 C). O método histoquímico TRAP evidenciou células clásticas latentes próximas à superfície óssea e radicular, padrão semelhante ao encontrado nos grupos anteriores (Figura 5.8 D e E).

Figura 5.8 - Fotomicrografias do grupo 18 dias ALN-MOV. Em A, grande área hialinizada (H) na região de terço apical ocupando todo o ligamento periodontal (LP) entre osso alveolar (OA) e cimento (Cem). Em B, área hialinizada (H) no ligamento periodontal entre o osso interradicular e furca. Osteoclasto latente (OcL). Em C, superfície do cimento (Cem) sem sinais de reabsorção. Em D e E, fotomicrografia de histoquímica TRAP mostrando osteoclastos (OcL) multinucleados com aspecto latente não aderidos a superfície óssea no osso interradicular (OI), em D, e do cimento (Cem), em E. A, 100X; B, 100X; C, 200X, D, 250X; E, 200X

5.2 Imunohistoquímica para RANKL e OPG

As reações de imunohistoquímica foram avaliadas considerando a distribuição das proteínas RANKL e OPG nos diferentes grupos experimentais. A expressão das proteínas foi evidenciada pela coloração acastanhada e avaliada seguindo padrão de distribuição.

A expressão da proteína RANKL nos grupos CON e ALN-CON, mostrou-se similar em todos os tempos, por isso será apresentada pelo grupo de 3 dias. Algumas células do ligamento periodontal apresentaram imunomarcação de cor acastanhadas enquanto outras células não apresentaram marcação (Figura 5.9). Já os grupos MOV e ALN-MOV exibiram marcação muito mais intensa no ligamento periodontal. No grupo MOV, a expressão foi bem evidente no ligamento periodontal e nas regiões adjacentes às lacunas de reabsorção tanto no tecido ósseo quanto no cimento e dentina. No grupo ALN-MOV a marcação se mostrou homogênea em todo o ligamento periodontal (Figura 5.10).

Os animais dos grupos CON e ALN-CON apresentaram marcação similar para OPG em células do ligamento periodontal e osteócitos e esse padrão de distribuição foi semelhante para todos os tempos experimentais (Figura 5.11). Os animais dos grupos 3, 10 e 18 dias MOV apresentaram leve marcação nos osteócitos e em células do ligamento periodontal (Figura 5.12 A e C e E). Já os espécimes grupo ALN-MOV apresentaram marcação mais intensa no osteócitos e em todo o ligamento periodontal. No tempo experimental de 18 dias no qual houve uma aumento das áreas hialinizadas, a marcação foi mais forte no ligamento periodontal, próximo as áreas hialinizadas e osteócitos. A marcação pareceu progredir levemente com o tempo. (Figura 5.12 B e D e F).

Figura 5.9 - Imunomarcção para RANKL. Fotomicrografias mostrando em A, espécime do grupo CON apresentando marcação em células do ligamento periodontal (setas). Em B, espécime do grupo CON-ALN, mostrando leve marcação em células do ligamento periodontal (setas). D, dentina; OA, osso alveolar. A, 200X; B, 200X

Figura 5.10 - Imunomarcacão para RANKL. Fotomicrografias mostrando em A, espécime do grupo 3 dias MOV, onde se observa região do ligamento periodontal (LP) com marcação uniforme. Em B, espécime do grupo 3 dias ALN-MOV, mostrando região do ligamento periodontal (LP) marcado uniformemente. Em C, espécime do grupo 10 dias MOV, mostrando marcação mais intensa nas células (setas) próximas a lacunas de reabsorção no osso alveolar (OA), caracterizadas por linhas mais escuras. Em D, espécime do grupo de 10 dias ALN-MOV, região de ligamento periodontal mais próximo ao ápice radicular. Em E, espécime do grupo de 18 dias MOV, mostrando marcação na região de reabsorção radicular. Notar células imuno positivas (setas). Cimento (Cem), área hialinizada (H). Em F, espécime do grupo 18 dias ALN-MOV, região interradicar com grande área de hialinização (H) e marcação em células imuno positivas (setas) um pouco distantes dessa áreas. Cimento (Cem), Osso alveolar (OA), ligamento periodontal (LP). A, 200X; B, 200X; C, 200X; D, 200X; E, 200X; F, 200X

Figura 5.11 - Imunomarcacão para OPG. Fotomicrografias mostrando em A, espécime do grupo CON, com imunomarcacão pouco intensa nas células do ligamento periodontal (LP) e osteócitos (Ot). Em B, espécime do grupo CON-ALN mostrando marcação nos osteócitos e canalículos na região de osso alveolar (OA). D, dentina. A, 200x; B, 200X

Figura 5.12 -Imunomarcção para OPG. Fotomicrografias mostrando em A, espécime do grupo 3 dias MOV, onde se observa região de osso alveolar (OA) com marcação nos osteócito (Ot). Em B, espécime do grupo 3 dias ALN-MOV com marcação acentuada nos osteócitos da região do osso alveolar. Em C, espécime do grupo 10 dias MOV, observar imuno marcação (setas) nas células do ligamento periodontal (LP). Em D, espécime do grupo 10 dias ALN-MOV, observar forte marcação nas células do ligamento periodontal (LP) e osteócitos. Em E, área hialinizada (H) e abaixo reabsorção radicular (seta) atingindo cimento com pouca marcação em células (asterisco) do ligamento periodontal. Em F, grande área hialinizada (H), cimento (Cem) com aspecto intacto e forte marcação nos osteócitos (Ot). A, 400x; B, 400X; C, 400X; D, 200X; E, 200X, F, 200X

5.3 Análise Ultraestrutural

Serão apresentados os resultados da análise ultraestrutural.

5.3.1 Grupo Controle (CON) e alendronato controle (ALN-CON)

O grupo controle (CON) apresentou aspectos normais do periodonto de sustentação, com a superfície do cimento lisa e contínua, assim como a do osso alveolar. Presença de poucos osteoclastos ativos e ligamento periodontal com fibrilas colágenas intactas e fibroblastos sem qualquer alteração em toda sua extensão (Figura 5.13). O grupo ALN-CON apresentou alguns osteoclastos com aspecto latente.

Figura 5.13 - Micrografias eletrônicas de transmissão ilustrando, em A, grupo controle mostrando a superfície do osso alveolar (OA). Notar a presença de osteócitos (Oct) em sua lacuna no interior da matriz mineralizada. Observar a presença de osteoblastos (OB) sob a superfície óssea. LP, ligamento periodontal. Em B, superfície intacta do cimento (Cem). A, 2000X; B, 2500X.

5.3.2 Grupo movimentação ortodôntica (MOV)

Em todos os períodos desse grupo (3d e 18d), o osso alveolar apresentou predominância de osteoclastos ativos com borda em escova desenvolvida e zona clara evidente, reabsorvendo matriz mineralizada. (Figuras 5.14 A, 5.15 A). Já a superfície do cimento apresentou-se lisa sem sinais de reabsorção no grupo de 3 dias (Figura 5.14 C), enquanto que no grupo 18 dias algumas regiões apresentaram-se reabsorvidas, atingindo a dentina. Clastos ativos foram encontrados aderidos à dentina e o ligamento periodontal apresentou-se hialinizado. (Figura 5.15 C).

5.3.3 Grupo movimentação ortodôntica tratado com alendronato (ALN-MOV)

Nos animais tratados em todos os tempos a superfície do osso alveolar apresentou sem grandes reabsorções, com osteoclastos em estado latente, encontrando-se distantes das superfícies mineralizadas. Mesmo as células mais próximas aos tecidos mineralizados não apresentaram zona clara e nem borda em escova (Figuras 5.14 B, 5.15 B) apresentando forma arredondada e núcleos dispersos no citoplasma com poucas organelas. O ligamento periodontal apresentou-se estreito com grandes áreas hialinizadas. A superfície do cimento apresentou-se lisa e continua sem qualquer alteração em todos os períodos estudados (Figuras 5.14 D, 5.15 D).

Figura 5.14 - Micrografias eletrônicas de transmissão do grupo de 3 dias ilustrando, em A espécime do grupo MOV mostrando osteoclasto ativo sobre (Oc) osso alveolar (OA). Em B, espécime do grupo ALN-MOV, mostrando osteoclasto latente (OcL) afastado do osso alveolar (OA). Em C, espécime do grupo MOV, com a superfície do cimento (Cem) intacta. Em D, espécime do grupo ALN-MOV, mostrando a superfície intacta do cimento (Cem). A, 2500x, B, 3000X, C, 3000X, D, 3000X

Figura 5.15 - Micrografias eletrônicas de transmissão ilustrando, em A espécime do grupo MOV onde se observa parte de um osteoclasto ativo (Oc) sobre osso alveolar (OA). Notar a presença de fibroblasto (Fb). Em B espécime grupo ALN-MOV, observa-se um osteoclasto latente (OcL), sem a formação da borda em escova, distante do osso alveolar (OA). Em C espécime do grupo MOV, clasto ativo (Cl) com borda em escova definida reabsorvendo superfície radicular, atingindo cimento (Cem) e dentina (D). Em D, espécime do grupo ALN-MOV mostrando superfície intacta do cimento (Cem). A, 3000X. B, 3000X, C, 3500X, D, 2500X.

5.4 Western Blotting

A expressão da proteína RANKL foi detectada na porção da tábua óssea vestibular aos dezoito dias dos grupos MOV e MOV-ALN.

A intensidade das bandas para RANKL foi semelhante em todos os grupos (Figura 5.16).

Figura 5.16 – Western Blotting. São ilustradas as bandas correspondentes aos pesos moleculares de RANKL, sendo a actina utilizada como controle. Observamos que as bandas apresentam intensidade semelhantes entre si

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo revelaram que o alendronato sódico (ALN) interfere na reabsorção óssea durante a movimentação ortodôntica, reação ocasionada pela inativação das células clásticas. O ALN apesar de impedir que essas células fossem ativadas, não interferiu no recrutamento dos seus precursores e sua fusão. Nos grupos MOV houve predomínio de clastos ativos reabsorvendo o osso alveolar e, em tempos maiores, até a superfície radicular, atingindo a dentina. Nos grupos ALN-MOV, os clastos apresentaram-se em estado latente, e grandes áreas de hialinização foram observadas no ligamento periodontal, e nenhuma área de reabsorção radicular.

Estudos experimentais para melhor elucidação do efeito do alendronato na movimentação ortodôntica vêm sendo realizados em animais, na sua maioria ratos, por ser um animal de fácil procriação, manejo e com semelhanças, nos seus molares, às estruturas dentoperiodontais humanas. No entanto, possuem como um dos maiores obstáculos o tamanho das estruturas envolvidas no processo de movimentação dentária, as quais por serem muito pequenas dificultam na elaboração de uma mecânica precisa, de modo que a maioria dos estudos utilizou molas de secção fechada de níquel titânio (Fugimura et al., 2009; Karras et al., 2009; Kaipatur et al., 2013). A biomecânica utilizada no presente estudo provou ser eficiente, transmitindo uma força contínua precisa de 15cN, de vestibularização sobre os molares do ratos (Bonafe-Oliveira et al., 2003).

No presente estudo com o intuito de interferir na atividade reabsortiva das células clásticas foi utilizado o ALN injetado, por ser o bisfosfonato mais utilizado atualmente no tratamento de diversas doenças ósseas, a pesar de que outros tipos de bisfosfonatos, tais como o risedronato (Adachi et al., 1994; Igarashi et al., 1996) clodronato (Liu et al., 2004) foram também utilizados em outros trabalhos. Neste estudo foi utilizada uma dose padronizada para o estudo de germes dentários (Massa et al., 2006) e depois utilizada para analisar o efeito do ALN no osso alveolar (Bradaschia-Correa et al., 2007), ambos em ratos em crescimento. Posteriormente, a mesma dose foi administrada a ratos adultos, como no presente trabalho, para avaliar doença

periodontal (Moreira et al., 2014). Em todos esses trabalhos foram constatados efeitos no tecido ósseo, principalmente a inibição da atividade clástica.

Assim, como esperado, o alendronato inibiu a reabsorção tanto do osso alveolar quanto dos outros tecidos mineralizados - dentina e cemento. Os espécimes que não receberam a droga apresentaram clastos ativos e sinais de reabsorção do osso alveolar nos grupos de 3, 10 e 18 dias, além de reabsorção do cemento e dentina, deixando a superfície radicular com aspecto irregular no grupo de 18 dias. Já os grupos que foram tratados com ALN apresentaram células clásticas latentes afastadas da superfície óssea, confirmando que o ALN não interferiu no recrutamento e fusão dos clastos, no entanto, impediu que fossem ativados, interferindo no processo de reabsorção óssea. O alendronato injetado é redistribuído para o osso, particularmente para as regiões de maior *turnover*. Nos osteoclastos, o alendronato inibe modificações pós traducionais essenciais para a atividade de GTPases, Ras, Rho e Rac (Russell, 2006) essenciais aos mecanismos de formação do aparato de reabsorção.

O efeito inibidor do alendronato sobre os osteoclastos ocasionou alterações na remodelação óssea. O mecanismo de remodelação óssea necessita da coordenação e o equilíbrio entre as funções de osteoclastos e osteoblastos. Durante a movimentação ortodôntica, no lado de pressão ocorre aumento na reabsorção da parede alveolar, enquanto no lado de tensão há um aumento na neoformação óssea. A diminuição da quantidade de movimentação dentária causada pelo uso de bisfosfonatos é uma das grandes preocupações na ortodontia e foi descrita por diversos autores (Adachi et al., 1994; Kim et al., 1999; Liu et al., 2004; Karras et al., 2009; Kaipatur et al., 2013) que demonstraram que essa diminuição é dependente da dose e do tempo de uso da droga. O presente trabalho não teve como objetivo a mensuração da quantidade de movimentação, no entanto, através da histoquímica para enzima TRAP, mostrou a presença de osteoclastos latentes distribuídos próximos a superfície óssea. Como a movimentação dentária é resultado da reabsorção óssea alveolar pelos osteoclastos nas áreas de pressão, os resultados deste trabalho sugerem que a movimentação dentária é diminuída com o uso de alendronato. A histoquímica para enzima TRAP

permitiu identificar também os clastos ativos que reabsorviam a superfície óssea nos grupos MOV.

A pressão exercida durante a movimentação ortodôntica dentária causa compressão do ligamento periodontal, levando a inflamação e gerando frequentemente áreas hialinizadas. Nos grupos tratados com alendronato, essas áreas foram muito mais extensas ao serem comparadas ao grupo MOV. Isso acontece devido à falta de remodelação óssea; como não houve a ativação dos osteoclastos, não ocorreu reabsorção do osso alveolar e do osso interradicular, causando um aumento maior na pressão exercida sobre o ligamento periodontal e com isso o aumento das áreas hialinizadas.

As reabsorções radiculares são um efeito colateral da atividade celular associada à remoção dos tecidos necróticos do ligamento periodontal muito comum durante a movimentação ortodôntica (Owman-Moll et al., 1996; Faltin et al., 2001; Casa et al., 2001) e foi encontrada no grupo MOV no 18º dia, atingindo o cimento e a dentina. A reabsorção é atribuída à quantidade de tempo que a biomecânica permaneceu ativa, havendo sido mais severa, atingindo a dentina, quanto maior foi o tempo de aplicação da força. Nos espécimes do grupo ALN-MOV, não foi encontrado nenhum grau de reabsorção radicular, possivelmente em decorrência da inativação dos odontoclastos, assim como dos osteoclastos. Nos primeiros estudos utilizando-se bisfosfonatos, Igarashi et al., 1996 utilizaram o risedronato na forma tópica durante a movimentação ortodôntica, demonstrando seu efeito na diminuição da quantidade de reabsorção radicular e, aparentemente, sem afetar o processo de reparação do cimento. Outros estudos mais recentes, que administraram bisfosfonatos de forma tópica (Igar et al., 1996) ou injetada, encontraram também diminuição da quantidade de reabsorção radicular (Liu et al., 2004; Fujimura et al., 2009); esses estudos sugeriram que uma aplicação tópica de bisfosfonatos pode ser utilizada para prevenção da reabsorção radicular durante o tratamento ortodôntico (Fujimura et al., 2009).

A reabsorção dos tecidos mineralizados é induzida pelo RANKL, molécula chave para a diferenciação e fusão dos clastos (Kobayashi et al., 2009). Neste modelo a expressão de RANKL não foi diminuída com o uso da droga, porém sua distribuição se mostrou diferente. No grupo ALN-MOV, a marcação

apresentou-se uniforme em todo o ligamento periodontal, já no grupo MOV apresentou-se mais intensa nas áreas de reabsorção óssea e radicular, sugerindo que sua expressão tenha sido maior uma vez que é o local onde há maior atividade dos osteoclastos. Tal fato está de acordo com a literatura: experimentos que realizaram movimentação ortodôntica em animais encontraram a expressão de RANKL aumentada no ligamento periodontal (fibroblastos e osteoblastos) nas áreas de compressão (Shiotani et al., 2001; Kim et al., 2007).

A localização de RANKL nessas regiões refletem sua biossíntese através de uma interação célula-célula entre osteoblastos-células mesenquimais, essencial para a formação de osteoclastos, sugerindo assim que as células do ligamento periodontal estão envolvidas no processo de diferenciação dos osteoclastos durante a movimentação ortodôntica (Kanzaki et al., 2002).

Apesar da expressão de RANKL não diminuir com a ação do ALN, o método histoquímico para TRAP permitiu observar que a quantidade de clastos não diminuiu no grupo tratado, portanto o ALN não interferiu no recrutamento e fusão dessas células. Assim, os osteoclastos dos grupos tratados, em sua maioria, não foram ativados, apresentando-se em estado latente, arredondados. É possível que as células clásticas recém fusionadas, quando entram em contato com a superfície óssea sofram interferências do ALN associado à matriz mineralizada, e se tornem latentes. Bradaschia-Correa et al. (2013), desenvolveram um estudo com ratos recém-nascidos, nos quais foi aplicado alendronato até os 30 dias de vida. A droga inibiu a expressão de RANKL, no grupo tratado. Porém as células precursoras foram recrutadas, e fusionadas, podendo observar um grande número de células clásticas latentes na região da cripta óssea. No único tempo estudado pelo Western Blotting neste trabalho, o RANKL pareceu não sofrer alteração, mesmo com a administração de ALN.

A imunomarcagem de OPG nos espécimes do grupo ALN-MOV foi observada nos osteócitos e células do ligamento com mais intensidade do que nos espécimes do grupo MOV. Foi observada também a expressão em canalículos e regiões de início de reabsorção. No grupo CON e CON-ALN, a expressão foi mais restrita aos osteócitos e com pouca intensidade. Os osteócitos possuem um papel importante regulação na remodelação óssea

regulando a atividade de osteoclastos e osteoblastos (Bonewald, 2011). A OPG, por sua vez, atua como receptora e é expressa por osteoblastos, desempenhando a função de inibir a reabsorção óssea quando se liga ao RANKL. Essa ligação entre RANKL/OPG é dez vezes mais potente do que a ligação entre RANK/RANKL, o que pode justificar a presença de RANKL em um tecido não reabsorvido.

Dunn et al. (2007) descreveram a diminuição da remodelação óssea durante a movimentação ortodôntica e indicaram a presença de OPG nas áreas de pressão no ligamento periodontal e um pequeno número de osteoclastos próximo ao osso alveolar. Em nosso trabalho, também encontramos uma maior expressão de OPG nas áreas onde a reabsorção estava diminuída. Shoji et al. (2010) realizaram um estudo em animais “knock out” para OPG, os quais foram injetados ou não com alendronato, observando que no grupo no qual foi administrado bisfosfonato, a movimentação dentária diminuía e o volume ósseo aumentava, confirmando o papel da OPG na ativação da osteoclastogênese.

Os mecanismos de reabsorção radicular são muito semelhantes aos de reabsorção óssea, as células clásticas apresentam morfologia semelhante a dos osteoclastos (Casa et al., 2006) e por isso o sistema RANK/RANKL/OPG regula também esse processo. No presente trabalho, a expressão de RANKL foi bem evidente nas áreas de reabsorção radicular que foi encontrada somente no 18º dia do grupo MOV, enquanto que a expressão de OPG nessa região não foi significativa. Low et al. (2005) relataram que o RNAm de RANKL foi detectado em vários tecidos, incluindo a superfície radicular que foi reabsorvida após ser submetida a forças ortodônticas. Esses resultados sugerem que a diferenciação de osteoclastos e odontoclastos nas áreas de reabsorção radicular são regulados por RANKL, que é produzido como um fator local por células do ligamento periodontal em resposta à força ortodôntica. Nos casos de grande reabsorção radicular, há uma super regulação de RANKL e células do ligamento periodontal podem aumentar a produção de RANKL para regular a osteoclastogênese, que explicaria o aumento de RANKL e a diminuição de OPG (Tyrovola et al., 2008; Nishijima et al., 2006).

Diversos estudos atribuem o efeito dos bisfosfonatos a alterações no mecanismo controlador da formação e ativação de osteoclastos por RANK/RAKL/OPG. A expressão de RANKL e OPG é elevada na doença de Paget, patologia caracterizada pelo aumento da reabsorção óssea por osteoclastos. O tratamento de pacientes com pamidronato diminui os níveis séricos de RANKL em indivíduos portadores dessa doença (Martini et al., 2007). Por outro lado, a análise da influência do alendronato na doença periodontal indica que o bisfosfonato inibe a reabsorção óssea, apesar de que a expressão do RANKL não seja inibida pela droga, já a expressão de OPG é aumentada (Moreira et al., 2014).

Nos últimos anos, diversas recomendações são dadas aos ortodontistas com pacientes que utilizam bifosfonatos. Estas incluem a obtenção de informações detalhadas do paciente sobre administração de bisfosfonato, sobre a duração do tratamento, a dose e a frequência de uso (Zahrowski, 2007). Isto deve ser seguido por uma avaliação cuidadosa dos benefícios versus os riscos do tratamento ortodôntico, devendo-se avaliar primeiro se o paciente está em alto ou baixo risco para a inibição da movimentação ortodôntica.

Os resultados do presente contribuem para o entendimento das reações teciduais frente à movimentação ortodôntica, bem como para o efeito de drogas antirreabsortivas, como o ALN, durante a movimentação ortodôntica.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- O alendronato não interferiu no recrutamento dos osteoclastos, apenas inibiu sua ativação e com isso houve uma diminuição na remodelação óssea necessária para a movimentação ortodôntica.
- A reabsorção radicular foi inexistente com a administração do alendronato.
- A expressão da proteína OPG aumentou com a administração do alendronato.
- A expressão da proteína RANKL não alterou com o tratamento com alendronato.

REFERÊNCIAS ¹

Adachi H, Igarashi K, Mitani H, Shinoda H. Effects of topical administration of a bisphosphonate (risedronate) on orthodontic tooth movements in rats. *J Dent Res*. 1994; 73(8):1478-84.

Arana-Chavez VE, Bradaschia-Correa V. Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 mar;41(3):446-50. doi: 10.1016/j.biocel.2008.09.007.

Arana-Chavez VE, Bradaschia-Correa V. *Biologia celular e tecidual para odontologia*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.

Beertsen, W., McCulloch, CA., Sodek, J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol*. 2000. 1997;13:20-40.

Bonafe-Oliveira L, Faltin RM, Arana-Chavez VE. Ultrastructural and histochemical examination of alveolar bone at the pressure areas of rat molars submitted to continuous orthodontic force. *Eur J Oral Sci*. 2003 Oct;111(5):410-6.

Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011 Feb;26(2):229-38. doi: 10.1002/jbmr.320.

Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol* 2000. 1997 (13):41-75.

Boyce FB, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008 May;473(2):139-46.

Bradaschia-Correa V, Massa LF, Arana-Chavez VE. Effects of alendronate on tooth eruption and molar root formation in young growing rats. *Cell Tissue Res*. 2007 Dec;330(3):475-85.

¹ De acordo com estilo Vancouver.

Bradaschia-Correa V, Moreira MM, Arana-Chavez VE. Reduced RANKL expression impedes osteoclast activation and tooth eruption in alendronate-treated rats. *Cell Tissue Res*. 2013 Jul;353(1):79–86. doi: 10.1007/100441-013-1623-9.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May;72:248-54.

Brudvik P, Rygh P. Non-clast cells start orthodontic root resorption in the periphery of hyalinized zones. *Eur J Orthod*. 1993 Dec;15(6):467-79.

Brudvik P, Rygh P. The repair of orthodontic root resorption: an ultrastructural study. *Eur J Orthod*. 1995, Jun;17(3):189-98.

Casa MA, Faltin RM, Faltin K, Sander FG, Arana-Chavez VE. Root resorptions in upper first premolars after application of continuous torque moment. *Intra individual atudy*. *J Orofac Orthop*. 2001 Jul;62(4):285-95.

Casa MA, Faltin RM, Faltin K, Arana-Chavez VE. Root resorption on torqued human premolars shown by tartrate-resistant acid phosphatase histochemistry and transmission electron microscopy. *Angle Orthod*. 2006 Nov;76(6):1015-21.

Castillo H, Samson-Fang L. Effects of bisphosphonates in children with osteogenesis imperfecta: an AACPDM systematic review. *Dev Med Child Neurol*. 2009 Jan;51(1):17-29. doi: 10.1111/j.1469-8749.2008.03222.x.

Coxon FP, Thompson K, Rogers MJ. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Jun;6(3):307-12.

Delaisse JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier, L. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech*. 2003 Aug;61(6):504-13.

Dunn MD, Park CH, Kostenuik PJ, Kapila S, Giannobile WV. Local delivery of osteoprotegerin inhibits mechanically mediated bone modeling in orthodontic tooth movement. *Bone*. 2007 Sep;41(3):446-55.

Faltin, RM, Faltin K, Sander FG, Arana-Chavez VE. Ultrastructure of cementum and periodontal ligament after continuous intrusion in humans: a transmission electron microscopy study. *Eur J Orthod*. 2001 Feb;23(1);35-49.

Franz-Odendaal, JA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*. 2006 Jan;235(1);176-90.

Fujimura Y, Kitaura H, Yoshimatsu M, Eguchi T, Kohara H, Morita Y, Yoshida N. Influence of bisphosphonates on orthodontic tooth movement in mice. *Eur J Orthod*. 2009 Dec;31(5):572-7. doi: 10.1093/ejo/cjp068.

Grzezik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(6); 474-84.

Hirashita A. The aspect of ultrastructural changes of the osteoblasts and surface areas of alveolar bone appearing in experimental tooth movement. *Bull Tokyo Med Univ*. 1976 Dec;23(4):245-60.

Igar K, Adachi H, Mitani H, Shinoda H. Inhibitory effect of the topical administration of a bisphosphonate (risedronate) on root resorption incident to orthodontic tooth movement in rats. *J Dent Res*. 1996 Sep;75 (9):1644-49.

Kaipatur NR, Wu Y, Adeeb S, Stevenson TR, Major PW, Doschakf MR. Impact of bisphosphonate drug burden in alveolar bone during orthodontic tooth movement in a rat model: A pilot study. *Am J of Orthod Dentofacial Orthod*. 2013 Oct;144(4):555-67. doi: 10.1016/j.ajodo.2013.06.015.

Karras JC, Miller JR, Hodges JS, Beyer JP, Larsone BE. Effect of alendronate on orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthod*. 2009 Dec; 66(6): 843-47. doi:10.1016/j.ajodo.2007.11.035.

Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear

factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res.* 2002 Feb;17(2):210-20.

Katchburian E, Arana-Chavez VE. *Histologia e embriologia oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.

Kim T, Handa A, Iida J, Yoshida S. RANKL expression in rat periodontal ligament subjected to a continuous orthodontic force. *Arch Oral Biol.* 2012 Mar; 52(3): 244-50.

Kim TW, Yoshida Y, Yokoya K, Sasaki T. An ultrastructural study of the effects of bisphosphonates administration on osteoclastic bone resorption relapse of experimentally moved rats molars. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1999 Jun, 115(6): 645-53.

Kobayashi Y, Nobuyuki U, Takahashi N. Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. *Critic Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009;19(1):61-72. Review

Krieger E, Hoedt B, Scheller H, Jacobs C, Walter C, Wehrbein H. [Orthodontic treatment of patients medicated with bisphosphonates- a clinical case report.] *J Orofacial Orthop.* 2013 Jan;74(1):28-39.doi: 10.1007/1000056-012-0120-1.

Lekic P, McCulloch CAG. Periodontal ligament cell populations: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec.* 1996 Jun;245(2):327-41.

Lerner UH. Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biol.* 2000 May;19(2):107-20.

Low E, Zoellner H, Kharbanda OP, Darendeliler MA. Expression of mRNA for osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa beta ligand (RANKL) during root resorption induced by the application of heavy orthodontic forces on rat molars. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2005 Oct;128(4):497-503.

Liu L, Igarashi K, Haruyama N, Sakei S, Shinoda H, Mitani H. Effects of local administration of clodronate on orthodontic tooth movement and root resorption in rats. *Eur J Orthod.* 2004 Oct;26(5):469-73.

Liu L, Igarashi K, Kanzaki H, Chiba M, Shinoda H, Mitani H. Clodronate inhibits PGE(2) production in compressed periodontal ligament cells. *Journal of Dental Res.* 2006 Aug;85(8):757–60.

Martini G, Gennari L, Merlotti D, Salvadori S, Franci MB, Campagna S, et al. Serum OPG and RANKL levels before and after intravenous bisphosphonate treatment in Paget's disease of bone. *Bone* 2007;40:457-63.

Massa LF, Arana-Chavez VE. Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiation. *Eur J Oral Sci.* 2000 Feb;108(1):74-7.

Massa LF, Bradaschia-Correa V, Arana-Chavez VE. Immunocytochemical study of amelogenin deposition during the early odontogenesis of molars in alendronate-treated newborn rats. *J Histochem Cytochem.* 2006 Jun;54(6):713-25.

Moreira MM, Bradaschia-Correa V, Marques ND, Ferreira LB, Arana-Chavez VE. Ultrastructural and imunohistochemical study of the effect of sodium alendronate in the progression of experimental periodontitis in rats. 2014. *Micros Res Tech.* 2014 Nov;77(11): 902-11. doi: 10.1002/jemt.22413.

Mulari M, Vääräniemi J, Väänänen HK. Intracellular trafficking in bone resorbing osteoclasts. *Micros Res Tech.* 2003 Aug;61(6):496-53.

Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol* 2000. 2006;40:11-28.

Nishijima Y, Yamaguchi M, Kojima T, Aihara N, Nakajima R, Kasai K. Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells in vitro. *Orthod Craniofac Res.* 2006 May;9(2):63-70.

Ortega AJ, Campbell PM, Hinton R, Naidu A, Buschang PH. Local application of zoledronate for maximum anchorage during space closure. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2012 Dec;142(6):780-91. doi:10.1016/j.ajodo.2012.07.010

Owman-Moll P, Kurol J, Lundgren D. Effects of doubled orthodontic force magnitude on tooth movement and root resorptions. An inter-individual study in adolescent. *Eur J Ortod.* 1996 Apr;18(2):141-50.

Reitan K. The initial tissue reaction incident to orthodontic tooth movement as related to the influence of function. *Acta Odontol Scand Suppl.* 1951;6:1-240.

Reitan K. Tissue behavior during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod.* 1960; 46:881-90.

Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer.* 2000 Jun15;88(12suppl):2961-78.

Russell, RG. Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone.* 2011 Jul;40(1):2-19. doi: 10.1016/j.bone.2011.04.022.

Russell RG. Bisphosphonates from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Apr;1068:367-401.

Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 2008 Jun;19(6):733-59. doi:10.1007/100198-007-0540-8.

Rygh, P. Ultrastructural cellular reactions in pressure zones of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. *Acta Odontol. Scand.* 1972a Nov;30(4):575-93.

Rygh P. Ultrastructural vascular changes in pressure zones of rat molar periodontium incident to orthodontic movement. *Scand J Dent Res.* 1972b;80(4):307-21.

Rygh, P. Ultrastructural changes in tension zones of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. *Am J Orthod.* 1976; 70:269-81.

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

Sato Y, Sakai H, Kobayashi Y, Shibasaki Y, Sasaki T. Bisphosphonate administration alters subcellular localization of vacuolar-type H⁺-ATPase and cathepsin K in osteoclasts during experimental movement of rat molars. *Anat Record.* 2000, Sep 2001;260(1):72–80.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chan MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997 Apr;89(2):309–19.

Shiotani A, Shibasaki Y, Sasaki T. Localization of receptor activator of NFκB ligand, RANKL, in periodontal tissues during experimental movement of rat molars. *J Electron Microsc (Tokyo).* 2001;50(4):365-69.

Shoji S, Tabuchi M, Miyazawa K, Yabumoto T, Tanaka M, Kadota M, Maeda M, Goto S. Bisphosphonate inhibits bone turnover in OPG^{-/-} mice via a depressive effect on both osteoclasts and osteoblasts. *Calcif Tissue Int.* 2010 Aug; 87(2):181–92. doi: 10.1007/100223-010-9384-x

Tanaka S, Nakamura I, Inoue JI, Oda H, Nakamura K. Signal transduction Pathways regulating osteoclast differentiation na function. *J Bone Miner Metab.* 2003;21(3):123-33.

Tyrovola JB, Spyropoulos MN, Makou M, Perrea D. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. *J Oral Sci.* 2008 Dec;50(4):367-76.

Thilander B, Rygh P, Reitan K. Tissue reactions in orthodontics. In: Graber, TM; Vanarsdall, RL. Vig, KWL. *Orthodontics: Currents principles and techniques.* 4. ed. St Louis: CV Mosby; 2005. p.145-217.

Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki, Tsurakou T, Itoh et al. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone* 1999 Nov;25(5):517-23.

Vitté C, Fleisch H, Guenther HL. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology* 1996 Jun, 137(6):2324-33.

Warshawsky H, Moore G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. *J Histochem Cytochem*. 1967 Sep;15(9):542-49.

Ultrastructural and immunohistochemical study of early repair of alveolar sockets after the extraction of molars from alendronate-treated rats. Yamamoto-Silva FP, Bradaschia-Correa V, Lima LA, Arana-Chavez VE. *Microsc Res Tech*. 2013 Jun;76(6):633-40. doi: 10.1002/jemt.22210.

Zahrowski JJ. Bisphosphonate treatment: a present orthodontic concern calling for a proactive approach. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007 Mar, 131(3):311–20.

ANEXO A- Parecer do comitê de ética

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **015/2013** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a). **Victor Elias Arana-Chavez** Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Estudo da expressão das moléculas reguladoras da remodelação do osso alveolar durante a movimentação ortodôntica com força contínua**" do qual participam o(s) pesquisador(es) **Natascha D'Andrea Mateus Marques e Vivian Bradaschia-Correa**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **30/07/2013**, com validade de **03 (três)** anos.

São Paulo, 30 de julho de 2013

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Presidente do CEUA-FOUSP