UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOPEDIATRIA

THAÍS APARECIDA XAVIER

**RETENÇÃO PROLONGADA DE DENTES DECÍDUOS:
POSSÍVEIS FATORES ETIOLÓGICOS LOCAIS E
SISTÊMICOS**

Ribeirão Preto

2016

THAÍS APARECIDA XAVIER

**RETENÇÃO PROLONGADA DE DENTES DECÍDUOS: POSSÍVEIS
FATORES ETIOLÓGICOS LOCAIS E SISTÊMICOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa: Odontopediatria

Área de concentração: Odontopediatria

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Yasuyo
Fukada Alves

Ribeirão Preto

2016

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.

Xavier, Thaís Aparecida.

Retenção prolongada de dentes decíduos: possíveis fatores etiológicos locais e sistêmicos / Thaís Aparecida Xavier; orientadora Sandra Yasuyo Fukada Alves.-- Ribeirão Preto, 2016.

71 f. : il.

Dissertação (Mestrado)--Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Infantil. Área de concentração: Odontopediatria.

1. Dente decíduo. 2. Esfoliação de dente. 3. Reabsorção óssea.

Xavier TA. **Retenção prolongada de dentes decíduos:** possíveis fatores etiológicos locais e sistêmicos

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Odontopediatria

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

THAÍS APARECIDA XAVIER

Nascimento: 6 de julho de 1988 – Viçosa/MG

Filiação: Maria dos Santos Nascimento Xavier

Silair Xavier

2007-2012: Graduação em Odontologia, pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora – FO/UFJF

2013-2014: Especialização em Odontologia Legal, pela Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP

2015-2015: Aperfeiçoamento em Atendimento Odontológico a Pacientes com Necessidades Especiais, pela Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP

2014-2016: Mestrado em Ciências, Área de Concentração em Odontopediatria, pela Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP

Dedicatória

*Aos meus pais, Santa e Silair, alicerces de cada etapa da minha vida, sem os
quais eu não teria chegado até aqui.*

À minha irmã, Ísis, companheira sempre.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da FORP/USP, pela privilegiada oportunidade de estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Em especial, à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Sandra Yasuyo Fukada Alves, por toda paciência e atenção no decorrer do curso, por confiar a mim a realização deste trabalho, pelos valiosos ensinamentos compartilhados e por ter me orientado com tamanha maestria. Obrigada!

À Prof^a. Dr^a. Andíara De Rossi Daldegan, por também me confiar a realização deste estudo e pela contribuição referente ao mesmo.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Galo, pelo direcionamento e pela colaboração relacionados à análise estatística.

À Eleni José Linjardi, pela gentileza e pelo comprometimento ao realizar as coletas de sangue dos pacientes.

Ao Prof. Dr. Francisco José Albuquerque de Paula, pela estimada orientação quanto às análises das amostras sorológicas.

Ao Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva, por esclarecimentos referentes a importantes passos laboratoriais.

Ao pós-doutorando Erivan Schnaider Ramos Junior, por explicações laboratoriais, e à mestrand Thaise Mayumi Taira, pelo gentil auxílio prestado.

Aos pacientes e seus responsáveis, que concordaram prontamente em participar desta pesquisa, tornando a mesma possível.

Aos Professores de Odontopediatria do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP, por todo o aprendizado que proporcionaram.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP, sempre atenciosos.

Às colegas de curso, sem as quais o mestrado não teria sido o mesmo, pela grande amizade e por me ajudarem inclusive em minha busca por pacientes para esta pesquisa.

E ao meu namorado Eduardo, pelo apoio constante e incondicional.

RESUMO

Xavier TA. Retenção prolongada de dentes decíduos: possíveis fatores etiológicos locais e sistêmicos [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2016, 71 f.

A reabsorção radicular é um evento fisiológico para os dentes decíduos. Porém, há casos em que esses dentes são mantidos à cavidade bucal além do tempo de esfoliação normal, mesmo quando os dentes permanentes sucessores estão presentes. Como são escassos os dados disponíveis sobre a real causa da retenção prolongada dos dentes decíduos, as razões exatas merecem ser investigadas. O objetivo desta pesquisa foi analisar se fatores locais (RANKL, RANK, OPG, MCP-1, RUNX2) ou sistêmicos (vitamina D, PTH, IGF-I) poderiam estar relacionados à biologia óssea e radicular em casos de retenção prolongada de dentes decíduos, com presença dos dentes permanentes correspondentes *in situ*, a fim de se buscar compreender possíveis etiologias do quadro. Para isso, foram selecionados pacientes com dentes decíduos em retenções prolongadas (n=14, grupo R) e pacientes sem dentes decíduos retidos (n=14, grupo C), mas com indicações ortodônticas de exodontias. Após as extrações dentais, foram coletados remanescentes do ligamento periodontal em torno das raízes dentais e amostras de sangue dos pacientes, que foram avaliados por qPCR e quimioluminescência, respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa para RANKL ($p=0,023$) entre os grupos C e R, com menor expressão gênica de RANKL no grupo R. Da mesma forma, foi observada uma menor expressão de RANK no grupo R, comparado ao grupo C; contudo, essa diferença não foi significativamente diferente. Houve também um resultado próximo do valor de significância para vitamina D ($p=0,0572$), com níveis séricos reduzidos dessa vitamina no grupo R. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para os outros fatores estudados. Com base nos dados deste estudo, pode-se sugerir que menores expressões de RANKL e RANK possam estar envolvidas na retenção prolongada de dentes decíduos e que baixos níveis séricos de vitamina D também possam estar associados com o retardo na esfoliação radicular decídua.

Palavras-chaves: 1. Dente decíduo. 2. Esfoliação de dente. 3. Reabsorção óssea.

ABSTRACT

Xavier TA. Persistent primary teeth: possible systemic and local etiological factors [dissertation]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, School of Dentistry of Ribeirão Preto, 2016, 71 f.

Root resorption is a physiological event for primary teeth. However, there are cases where these teeth are maintained beyond the normal exfoliation time, even when the corresponding permanent teeth is present. Since there are few data concerning the real cause of prolonged retention of primary teeth, the exact reasons must be investigated. The aim of this study was to assess if local factors like RANKL, RANK, OPG, MCP-1, RUNX2, or systemic factors such as vitamin D, PTH and IGF-I could to be involve in the bone and root biology, in cases of persistent primary teeth, with the corresponding permanent teeth *in situ*. Patients with persistent primary teeth (n=14, group R) and patients without persistent primary teeth (n=14, group C), but with orthodontic indication of tooth extraction, were selected. After the teeth extractions, remaining periodontal ligament around the roots and blood samples were collected and assessed by qPCR and chemiluminescence, respectively. The present study found significant lower level of RANKL in the group R compared to group C ($p=0,023$). Although it was not significantly different, the level of RANK was also reduced in group R compared to group C. The expression of others local factors was similar between group R and C. Concernig systemic factors, the serum level of vitamin D were reduced in the group R compared to group C ($p=0,0572$) although it was not statistically significant. There were no significant differences between both groups for the others systemic studied factors. It is possible that a lower RANKL and RANK expression is involved in prolonged retention of primary teeth and our data also suggest that low serum levels of vitamin D could also be involved in the etiology of the retention.

Keywords: 1. Primary teeth. 2. Tooth exfoliation. 3. Bone resorption.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Mecanismos envolvidos na erupção dental.....	13
1.2 Mecanismos reguladores da remodelação óssea e da reabsorção radicular.....	14
1.3 Fatores sistêmicos relacionados à remodelação óssea e à reabsorção radicular.....	14
2 PROPOSIÇÃO.....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Aspectos éticos.....	22
3.2 Critérios de inclusão.....	22
3.3 Critérios de exclusão.....	23
3.4 Amostras e dados.....	23
3.4.1 Índice de massa corporal.....	23
3.4.2 Raspado radicular.....	25
3.4.2.1 Processamento das amostras.....	25
3.4.2.2 Extração do RNA mensageiro e síntese do DNA complementar.....	26
3.4.2.3 qPCR em tempo real.....	26
3.4.3 Coleta de sangue.....	27
3.4.3.1 Dosagem de vitamina D por ensaio de quimioluminescência.....	27
3.4.3.2 Dosagem de PTH por ensaio de quimioluminescência.....	28
3.4.3.3 Dosagem de IGF-I por ensaio de quimioluminescência.....	28
3.5 Análise estatística.....	28
4 RESULTADOS.....	31
4.1 Análise dos parâmetros individuais.....	31
4.2 Avaliação da expressão gênica de fatores locais moduladores das reabsorções óssea e radicular.....	32
4.3 Avaliação de fatores sistêmicos como possíveis moduladores da remodelação óssea e da reabsorção radicular.....	36

5 DISCUSSÃO.....	40
6 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	49
APÊNDICE A.....	63
APÊNDICE B.....	64
APÊNDICE C.....	65
ANEXO A.....	67
ANEXO B.....	70
ANEXO C.....	71

1 Introdução

1.1 Mecanismos envolvidos na erupção dental

A reabsorção radicular é um evento fisiológico para o dente decíduo¹. De extrema importância para o desenvolvimento normal da dentição permanente e da face^{2,3}, tal processo pode ocorrer tanto na presença, quanto na ausência do dente permanente sucessor¹. No desenvolvimento normal da dentição, as raízes decíduas sofrem reabsorção fisiológica gradual e concomitantemente com a erupção dos dentes permanentes subjacentes⁴ que, por sua vez, encontram-se em um processo biológico contínuo, pelo qual emergem dos maxilares e atravessam a mucosa sobrejacente, para então irromperem na cavidade bucal^{5,6}.

No processo de erupção dental, que requer reabsorção do osso alveolar e da raiz do dente decíduo correspondente, os osteoclastos e odontoclastos participam como células ativas e responsáveis pelas reabsorções óssea e radicular, respectivamente^{7,8}. Enquanto os osteoclastos são células amplas multinucleadas, derivadas da fusão de células de origem hematopoiética, da linhagem mielóide^{9,10}, os odontoclastos apresentam-se como células similares^{11,12}, de mesma origem, porém menores¹², embora não esteja esclarecido se somente células hematopoiéticas e monócitos do sangue sejam os únicos precursores dos odontoclastos¹³. Mas ambos tipos celulares, osteoclastos e odontoclastos, são necessários para erupção e consequente irrupção dos dentes permanentes¹⁴, sendo que a reabsorção radicular decídua é regulada de forma similar à remodelação óssea^{1,15}.

A remodelação óssea é um processo metabólico caracterizado por um equilíbrio preciso entre a degradação (reabsorção) e a síntese da matriz óssea, em que os osteoclastos e os osteoblastos¹⁶ (sendo os osteoblastos as células responsáveis pela formação óssea)¹⁷ desempenham um papel fundamental¹⁶. Enquanto isso, a erupção dental é um processo mais complexo que envolve, além da remodelação óssea, a formação do dente permanente e a reabsorção do correspondente decíduo, em que se fazem presentes além dos osteoclastos e osteoblastos, células como os odontoclastos e odontoblastos^{1,18-20}.

1.2 Mecanismos reguladores da remodelação óssea e da reabsorção radicular

No que se refere ao processo conjunto de erupção do dente permanente e reabsorção fisiológica do dente decíduo, o mecanismo que impulsiona o dente sucessor através da via de erupção é, até o momento, controverso e não totalmente compreendido^{2,5,21-23}. Sabe-se que o folículo dental, saco de tecido conjuntivo frouxo que circunda cada dente incluso⁸, tem papel fundamental no processo de reabsorção do osso alveolar e favorece a formação da via de erupção^{8,22,24}, fornecendo reguladores chaves da osteogênese e da reabsorção óssea²³. Sobre esses reguladores, estudos demonstram que o folículo secreta o fator estimulador de colônia 1 (CSF-1) e a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), ambos recrutadores de monócitos, ou seja, de pré-osteoclastos. A presença desse progenitor celular, o folículo dental, juntamente com citocinas adequadas, dá início aos eventos para a formação dos osteoclastos que, como dito anteriormente, são responsáveis pela reabsorção óssea durante a erupção dental^{8,13,20,24-26}. Além disso, o folículo expressa também relevantes fatores para a remodelação óssea, como o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG), importantes para a formação de osteoclastos, bem como o fator de transcrição relacionado ao Runt 2 (RUNX2), importante para a formação de osteoblastos^{8,13,20,24,25,27-29}.

O RANKL e a OPG pertencem a um importante sistema descoberto na década de 1990 e que representa um dos maiores avanços da biologia óssea: o sistema RANKL/RANK/OPG²¹. O RANKL é uma proteína expressa por osteoblastos^{17,30}, odontoblastos, fibroblastos e cementoblastos³¹, encontrada também em vários tecidos, como de linfonodos, timo, glândulas mamárias, pulmões, baço e medula óssea³⁰; o receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) é receptor para RANKL e tem sido detectado em pré-osteoclastos, osteoclastos maduros e células dendríticas^{32,33}; quanto à OPG, é um receptor chamariz para o RANKL, secretada por osteoblastos, odontoblastos e cementoblastos, que se liga ao RANKL e o inativa^{34,35}. A ativação do receptor RANK, membro da família do fator de necrose tumoral (TNF), regula a diferenciação osteoclástica e, portanto, a remodelação óssea^{15,36}. Inicialmente, pré-osteoclastos, que expressam RANK, são ativados pelo RANKL por uma interação célula-célula e diferenciam-se em osteoclastos¹⁷; enquanto isso, a OPG inibe a diferenciação dos osteoclastos e protege o osso de reabsorção excessiva ao

se ligar ao RANKL, prevenindo a ligação deste ao RANK²¹. Dessa forma, o sistema RANKL/RANK/OPG regula a remodelação alveolar, bem como a reabsorção radicular fisiológica, por controlar tanto a diferenciação de osteoclastos¹⁵, quanto a de odontoclastos^{15,37}.

Com relação ainda à osteoclastogênese, uma quimiocina que a estimula indiretamente, sendo também relevante para a remodelação óssea, é a MCP-1, membro chave da família das quimiocinas C-C, comumente encontrada em locais de erupção dental²⁷. Produzida por uma variedade de células, como fibroblastos, células endoteliais, células do músculo liso, linfócitos e macrófagos³⁸, esta quimiocina é também conhecida como CCL2 (quimiocina motivo C-C ligante 2) e é um importante fator quimiotático para monócitos³⁹ e macrófagos¹⁰, que são células precursoras de osteoclastos. A MCP-1 participa dos mecanismos fundamentais de diferenciação de pré-osteoclastos⁴⁰ e de ativação de osteoclastos⁴¹, o que faz ao promover quimiotaxia e sobrevivência dessas células^{42,43}, tratando-se então de uma quimiocina importante para a osteoclastogênese^{44,45}.

Enquanto os osteoclastos maduros são células especializadas na reabsorção óssea, os osteoblastos são as responsáveis pela síntese óssea. Os osteoblastos são derivados de células mesenquimais indiferenciadas¹⁷ e, para se diferenciarem, expressam o RUNX2, um relevante fator de transcrição de genes importantes para formação e ativação odontoblásticas⁴⁶⁻⁴⁹. Este fator contém um domínio rico em glutamina/alina em sua extremidade N-terminal e uma região rica em prolina/serina/treonina em sua extremidade C-terminal^{46,47}. O RUNX2 atua como principal fator de transcrição da diferenciação osteoblástica^{50,51}, sendo essencial nesse processo⁵²; é expresso por pré-osteoblastos⁵³ e atua em vários passos do desenvolvimento ósseo, já que determina a linhagem de osteoblastos a partir do recrutamento de células mesenquimais pluripotentes, estimula a diferenciação de osteoblastos na fase inicial, além de agir na maturação de condrócitos e na especificação de fenótipos da cartilagem^{48,53-56}.

O RUNX2 é responsável pela ativação de genes marcadores da diferenciação de osteoblastos⁵¹, como os genes de proteínas da matriz óssea, incluindo colágeno tipo 1 alfa 1 (COL1A1), fosfoproteína secretada 1 (SPP1), sialoproteína ligada a integrina (IBSP), proteína carboxiglutamato gama óssea (BGLAP) e fibronectina 1 (FN1)⁵³, além de regular a expressão de osteopontina (OPN), sialoproteínas ósseas (BSPs) e osteocalcina (OCN)⁵⁶. Ao regular a expressão de genes principais da matriz

óssea durante a fase inicial da diferenciação de osteoblastos, o RUNX2 é fundamental na remodelação óssea, uma vez que os osteoblastos promovem a diferenciação dos osteoclastos, através da expressão de RANKL, assim como a inibição, através da produção de OPG⁵⁷.

1.3 Fatores sistêmicos relacionados à remodelação óssea e à reabsorção radicular

Todo o processo de reabsorção dos tecidos duros é resultado não somente da ação de fatores regulatórios locais, mas também de fatores sistêmicos, como a vitamina D, um hormônio esteroide com diversas ações biológicas, que apresenta como suas principais funções a homeostase de cálcio e a regulação do metabolismo ósseo⁵⁸, sendo que para isso a vitamina D atua na absorção de cálcio e fósforo intestinais e na reabsorção de cálcio dos rins⁵⁹. A manutenção de níveis adequados de vitamina D, identificados na circulação sistêmica, são associados com alta massa óssea e menor risco de fratura⁶⁰. A forma deste composto endógeno produzida por seres humanos é a vitamina D₃, que através de hidroxilações no organismo torna-se 25 hidroxivitamina D₃ (25(OH)D₃), forma geralmente dosada para determinar níveis séricos de vitamina D, e 1,25 dihidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃), sua forma mais biologicamente ativa. Para exercer sua ação, a vitamina D se liga ao seu receptor, denominado receptor da vitamina D (VDR)⁵⁹, que por sua vez atua como um fator de transcrição nuclear que regula a expressão gênica em vários tipos celulares⁶¹ e que é expresso por osteoblastos imaturos⁶². Desta forma, a vitamina D pode estimular a osteoblastogênese^{63,64}, embora tenha sido mostrado *in vitro* que esta vitamina também estimula a osteoclastogênese, atuando da mesma forma através de seu receptor nuclear^{60,63}, expresso por osteoclastos⁶⁵.

Dentre os hormônios importantes para a remodelação óssea, há um conhecido por atuar com a vitamina D na captação de cálcio e por apresentar relação sérica inversa com a mesma: o hormônio da paratireoide (PTH)¹²¹. Também conhecido como paratormônio, é secretado pelas glândulas paratireoides e é o principal regulador endócrino da concentração de cálcio no sangue, embora os mecanismos sobre como isso ocorra não sejam totalmente conhecidos. Com relação

à remodelação óssea e à reabsorção radicular, tem sido mostrado que esse hormônio induz formação e atividade de osteoclastos, ao induzir a expressão de RANKL nos osteoblastos⁶⁶, além de aumentar a expressão de RANKL e diminuir a de OPG pelas células do ligamento periodontal⁶⁷. Através de seu receptor, o receptor do hormônio da paratireoide tipo1 (PTHrP), um membro da superfamília de receptores acoplados à proteína G⁶⁸ expresso por diferentes tipos de tecidos (como ossos, rins e germe dental)^{19,68,69}, o PTH tem suas ações mediadas para manter a homeostase de cálcio e a remodelação óssea⁶⁸. Um dos mecanismos pelo qual o PTH regula os níveis de cálcio sérico e a remodelação óssea ocorre ao se ligar ao PTHrP presente nas células osteoblásticas, para efetuar a sinalização que induz a expressão e a secreção de RANKL, que então se liga ao seu receptor RANK na superfície dos pré-osteoclastos, para promover a diferenciação destes^{70,71}.

Há ainda outro componente sistêmico relevante para a manutenção da arquitetura óssea: fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), principal hormônio circulatório produzido pelo fígado, especialmente em resposta ao hormônio do crescimento^{72,73}. O IGF-I é um peptídeo multifuncional que pode estimular a diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais da medula óssea⁷⁴ e é sintetizado por uma variedade de tipos celulares⁷², como pré-osteoblastos, osteoblastos maduros^{73,75-77}, osteócitos, osteoclastos^{73,76} e condrócitos⁷⁶. Quando liberado da matriz óssea em resposta à reabsorção osteoclástica, o IGF-I induz a diferenciação de células tronco mesenquimais e estimula a função dos osteoblastos. Nesse processo, nova formação óssea ocorre nos locais de reabsorção, para manter a microarquitetura e a integridade mecânica do osso em cada ciclo de remodelação⁷³.

Como descrito, uma série de eventos moleculares e celulares atuam no sentido de promover as reabsorções óssea e radicular. Mas apesar da ação desses fatores que modulam a reabsorção, os dentes decíduos ainda podem ser mantidos na cavidade bucal além do tempo de esfoliação normal com relativa frequência, sendo que o motivo de maior ocorrência para essa persistência é a ausência congênita do dente permanente sucessor^{4,78}. Porém, em dadas situações, mesmo quando o dente permanente está presente, este pode não erupcionar, deixando o dente decíduo *in situ*. São escassos os dados disponíveis sobre a real causa da permanência do dente decíduo e impactação do dente permanente. Portanto, as razões exatas deste fenômeno merecem ser investigadas⁷⁸.

Apesar de serem conhecidas, individualmente, as funções dos diversos fatores locais e sistêmicos citados e as suas diversas ações biológicas, como o controle da homeostase de cálcio e a regulação do metabolismo ósseo, não está claro qual a relação desses componentes com a lenta reabsorção radicular dos dentes decíduos e o que favorece a permanência desses dentes *in situ* por um período maior de tempo. Avaliar os fatores citados nas ocorrências desses casos pode trazer elucidações a respeito, que podem então viabilizar benefício clínico futuro aos pacientes com o quadro de retenção prolongada de dentes decíduos, em que há presença do dente permanente sucessor.

2 Proposição

O presente trabalho tem como objetivo avaliar os fatores locais (RANKL, RANK, OPG, MCP-1, RUNX2) e sistêmicos (vitamina D, PTH, IGF-I), sob a perspectiva do quadro de retenção prolongada de dentes decíduos, em casos em que há presença dos dentes permanentes correspondentes *in situ*.

Materiais e métodos

3 Materiais e métodos

3.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi enviado para análise do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e aprovado sob parecer consubstanciado nº 1.084.058 (Anexo A). Após a aprovação, foram selecionados pacientes das clínicas de Odontopediatria e de Ortodontia da FORP/USP que se encontravam com dentes decíduos em retenção prolongada, além de pacientes que não apresentavam essa condição, mas que fariam extração de dentes decíduos por indicação ortodôntica. Participaram do estudo os pacientes que assinaram os Termos de Assentimento Livre e Esclarecido (Anexos C e D, Apêndices B e C) e cujos responsáveis assinaram os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B, Apêndice A), elaborados de acordo com a Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, respeitando as diretrizes e normas regulamentadas de pesquisas que envolvem seres humanos.

3.2 Critérios de inclusão

Para o grupo R (Retenção), foram selecionados pacientes (n=14) de ambos os sexos, que apresentavam retenção prolongada de dentes decíduos. Os pacientes foram diagnosticados como portadores de retenção prolongada de dentes decíduos associando-se idade e cronologia normal de irrupção⁷⁹ à persistência dos dentes decíduos por um ano além do período normal de esfoliação^{4,78}, além de exames clínico e radiográfico periapical, devendo o dente permanente sucessor apresentar mais da metade da raiz formada e, o dente decíduo, menos da metade da raiz reabsorvida, estando este firmemente aderido ao osso alveolar.

Para o grupo C (Controle), foram selecionados pacientes (n=14) de ambos os sexos, que não apresentavam casos de dentes decíduos retidos à cavidade bucal

além do tempo normal de esfoliação, mas que se encontravam sob indicação ortodôntica de exodontia.

3.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo casos em que se constatarem ausência de dente permanente sucessor, anquilose ou comprometimento endodôntico do dente decíduo retido ou do caso controle (com ou sem lesão periapical visível radiograficamente), além de pacientes que fossem portadores de doenças sistêmicas ou síndromes.

3.4 Amostras e dados

3.4.1 Índice de massa corporal

Além dos dados inicialmente obtidos sobre cada paciente, para incluí-los no estudo, foram também coletados os valores de estatura e massa corporal, para cálculo do IMC (índice de massa corporal), pela seguinte equação⁸⁰:

$$\text{IMC} = \frac{\text{massa corporal, em kg}}{\text{estatura, em m}^2}$$

Para análise, o resultado de cada IMC foi examinado de acordo com os dados de referência da Organização Mundial de Saúde (OMS)⁸⁰, preconizados também pelo Ministério da Saúde⁸¹. Após o cálculo do IMC, pela fórmula acima descrita, o valor obtido foi observado em um gráfico de valores referenciais de IMC e idade, de acordo com o sexo, relacionados a percentis correspondentes (Figuras 1 e 2). De acordo com o percentil indicado pela relação entre IMC, idade e sexo, obteve-se a condição em que se encontrava cada indivíduo dos grupos estudados, de acordo com a seguinte relação:

- percentil < 3 → abaixo do peso;
- percentil ≥ 3 e < 85 → peso adequado;
- percentil ≥ 85 e < 97 → sobrepeso;
- percentil ≥ 97 → obesidade.

Os dados de sexo, idade, estatura e massa corporal foram utilizados para verificar se haveria alguma relação entre retenção prolongada de dentes decíduos e valores inadequados de IMC (correspondentes a percentil < 3 e ≥ 85).

Partindo da premissa de que IMC alterado pode acarretar modificações no desenvolvimento e na cronologia de erupção e irrupção dentais^{5,82-86}, mesmo sendo essas alterações geralmente relacionadas à aceleração e não ao atraso de desenvolvimento e irrupção dos dentes, buscou-se avaliar se alterações do IMC, inclusive indicativas de baixo peso, estariam associadas com a lenta reabsorção radicular dos casos pesquisados.

Figura 1 – Representação gráfica do IMC em relação a idade (entre 5 e 19 anos de idade), evidenciando os percentis considerados para indivíduos do sexo feminino. Dados referenciais da OMS, 2007.

Figura 2 – Representação gráfica do IMC em relação a idade (entre 5 e 19 anos de idade), evidenciando os percentis considerados para indivíduos do sexo masculino. Dados referenciais da OMS, 2007.

3.4.2 Raspado radicular

3.4.2.1 Processamento das amostras

Logo após a extração dental, o dente decíduo teve sua raiz, ou remanescente radicular, raspado com cureta periodontal Gracey nº 5-6. O material foi acrescentado a um tubo coletor contendo 175µL de tampão de lise (RNA Lysis Buffer associado a β-mercaptoetanol). Os tubos foram então armazenados a -20°C para posterior avaliação pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), para avaliação da expressão gênica dos fatores RANKL, RANK, OPG, MCP-1 e RUNX2 (identificados pelos primers *TNFSF11*, *TNFRSF11A*, *TNFRSF11B*, *CCL2* e *RUNX2*, respectivamente) pelo Sistema de Isolamento de RNA Total SV, Promega™.

3.4.2.2 Extração do RNA mensageiro e síntese do DNA complementar

Primeiramente, foi realizada a extração do RNA mensageiro (mRNA) das amostras obtidas, de acordo com as indicações do fabricante. Após a extração, o mRNA foi ressuspenso em água livre de nuclease e quantificado em nanofotômetro (NanoPhotometer® P360, Implén). Em sequência, seguiu-se com a síntese de DNA complementar (cDNA), pela transcrição reversa do RNA, em solução de 10 µL com água livre de nuclease. A solução foi levada ao termociclador (Eppendorf vapo.protect™), seguindo os determinados tempos e temperaturas: 70°C (5 minutos), 4°C (5 minutos), 25°C (5 minutos), 42°C (60 minutos), 70°C (15 minutos), 4°C (até a remoção dos tubos do aparelho). Após o ciclo, o cDNA obtido foi armazenado a -20°C até o momento de uso.

3.4.2.3 qPCR em tempo real

Para as reações de qPCR de cada amostra, alíquotas de 2 µL de cDNA foram adicionadas ao mix de 5 µL de TaqMan Fast Advanced Master Mix, 0,5 µL de TaqMan Gene Expression Assay, 0,5 µL de GADPH e 2 µL de água livre de nuclease, para um volume final de 10 µL/poço. Os primers e sondas para *TNFSF11* (Hs00243522), *TNFRSF11A* (Hs00921372), *TNFRSF11B* (Hs00900358), *CCL2* (Hs00234140) e *RUNX2* (Hs00231692) foram obtidos comercialmente e são propriedades privadas do fornecedor TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems™.

A amplificação foi realizada em termociclador (StepOnePlus™ Real Time PCR System), nas seguintes condições: 50°C, 2 minutos, para incubação; 95°C, 20 segundos, para ativação da polimerase AmpliTaq Gold Enzyme; 95°C, 40 ciclos de 1 minuto, para desnaturação do DNA; e 60°C, 20 segundos, para anelamento do primer e extensão.

Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar (Ct, cycle threshold), correspondente ao número do ciclo obtido na fase de amplificação exponencial das amostras. O cálculo da expressão relativa dos genes foi normalizado

pela expressão na condição controle, pela diferença entre ΔCt das amostras (Ct do gene alvo – Ct do gene endógeno constitutivo) e a média obtida do ΔCt das amostras controles, resultando os valores $\Delta\Delta Ct$ de cada indivíduo. Em sequência, foi realizado o cálculo da expressão de cada gene avaliado com base na seguinte equação⁸⁷:

$$\text{Expressão relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.4.3 Coleta de sangue

As amostras de sangue (4 mL) foram coletadas após as exodontias, no Serviço de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em um tubo BD Vacutainer® tipo seco, para análise sorológica. As amostras foram centrifugadas a 1300 RCF (força centrífuga relativa), por 10 minutos, a 20°C, para separação do soro, que foi coletado e armazenado a -20°C, para posterior análise, por quimioluminescência, dos níveis de vitamina D e PTH, pelos kits Liaison® (DiaSorin), e de IGF-I, pelo kit IMMULITE® 2000 Immunoassay System (Siemens).

3.4.3.1 Dosagem de vitamina D por ensaio de quimioluminescência

Para dosagem de vitamina D, pelo ensaio LIAISON® 25 OH Vitamin D, após a introdução das amostras no Analisador LIAISON®, houve a primeira incubação, em que a 25(OH)D foi dissociada da sua proteína de ligação e ligou-se ao anticorpo específico na fase sólida. Ao fim de 10 minutos, foi adicionado o marcador vitamina D ligado a um derivado de isoluminol. Após uma segunda incubação de 10 minutos, o material não ligado foi removido com um ciclo de lavagem. Subsequentemente, os reagentes iniciadores foram então adicionados e iniciou-se uma reação quimioluminescente rápida. O sinal de luz foi medido por um fotomultiplicador como unidades de luz relativas (RLU), sendo inversamente proporcional à concentração de 25(OH)D presente nos calibradores, nos controles ou nas amostras.

3.4.3.2 Dosagem de PTH por ensaio de quimioluminescência

Para a dosagem do PTH, pelo ensaio LIAISON® N-TACT® PTH Gen II, utilizaram-se 150 µL de cada amostra recolhida com um tampão de ensaio e um anticorpo policlonal conjugado com isoluminol e purificado por afinidade contra a região 1-34 da molécula PTH 1-84. Após a incubação, partículas paramagnéticas revestidas com um segundo anticorpo policlonal e com tendência a ligar-se na região C-terminal (39-84) da molécula PTH 1-84 foram adicionadas à reação e incubadas. Após a segunda incubação, o material não ligado foi removido com um ciclo de lavagem. Os reagentes iniciadores foram então adicionados e iniciou-se uma reação quimioluminescente rápida. O sinal de luz foi medido por um fotomultiplicador RLU, sendo proporcional à concentração de PTH intacta presente nos calibradores, nos controles ou nas amostras.

3.4.3.3 Dosagem de IGF-I por ensaio de quimioluminescência

Para dosagem do IGF-I, utilizou-se sistema IMMULITE® 2000 Immunoassay System (Siemens), que usa esferas de poliestireno revestidas com anticorpos específicos. Após incubação com a esfera, a amostra sofreu uma segunda incubação com o reagente de fosfatase alcalina. Entre incubações, o tubo de reação passou por lavagens sucessivas em um espaço de segundos, por um sistema de centrifugação, para remover excessos de reagentes. A camada ligada à esfera foi então quantificada usando um substrato quimioluminescente próprio. A quantidade de luz emitida foi detectada pelo fotomultiplicador e quantificada.

3.5 Análise estatística

Os valores obtidos pela PCR e pelos exames sorológicos foram tabelados. Os dados não paramétricos (referentes a RANKL, RANK, OPG, MCP-1 e RUNX2) foram

analisados pelo teste de Mann-Whitney e, os dados que apresentaram distribuição normal (referentes a vitamina D, PTH e IGF-I), pelo teste t de Student, ambos com nível de significância de 5%. Os gráficos foram construídos com o programa GraphPad Software 5.0, com os dados representados pela média $\pm$ erro padrão (SEM).

4 Resultados

4.1 Análise dos parâmetros individuais

Para analisar se as condições relativas ao IMC individual poderiam interferir no desenvolvimento dental, sob as condições dos indivíduos deste estudo, tomaram-se os dados referentes a cada paciente (sexo, IMC, dente extraído), dos grupos controle (C) e com retenção prolongada decídua (R), que estão demonstrados na Tabela 1. Os dados da tabela mostram que o grupo R não apresentou diferença de prevalência quanto ao gênero, ou seja, apresentou 50% de pacientes do sexo feminino e 50% do sexo masculino.

Tabela 1: Sexo, IMC e dentes extraídos dos pacientes dos grupos C e R.

Grupo C				Grupo R			
Indivíduo	Sexo	IMC	Dente(s) extraído(s)	Indivíduo	Sexo	IMC	Dente(s) extraído(s)
1	F	25,04*	84	1	M	14,92	71, 81**
2	F	21,89*	84	2	F	15,98	75, 85
3	M	18,74	63	3	F	22,02*	84
4	M	15,31	85	4	M	16,92	75
5	F	27,53*	75	5	F	17,50	75
6	F	25,03*	71	6	M	24,62*	84
7	M	15,46	71	7	M	18,35	54
8	M	18,34	64, 75, 85**	8	M	16,84	71**, 81
9	M	18,64	63	9	F	22,28*	53, 63**
10	M	14,54	65	10	M	18,31	75
11	F	16,67	62	11	M	15,67	71
12	M	21,65*	85	12	F	22,39*	53, 63**
13	M	17,44	54, 84**	13	F	13,71	71
14	M	15,51	71	14	F	14,37	62

*: IMC de pacientes com sobrepeso ou obesidade.

**: Dentes selecionados para coleta de material, devido à maior preservação radicular.

A análise do IMC de cada indivíduo mostrou que os participantes do estudo apresentaram índices tanto adequados, quanto de sobrepeso ou obesidade. Aqueles em condição de sobrepeso ou obesidade (marcados com um asterisco na Tabela 1) não mostraram associação específica com retenção prolongada, nem com esfoliação radicular decídua normal. Com relação aos dentes indicados para extração, os mais

comuns foram os inferiores, principalmente os molares, tanto no grupo de indivíduos controles, quanto no grupo de indivíduos com retenção prolongada de dentes decíduos, o que pode ser atribuído ao osso mandibular ser mais compacto do que o maxilar e à própria estrutura radicular mais robusta dos molares decíduos, quando em comparação com a dos demais dentes dos arcos.

Embora alguns pacientes tenham apresentado a indicação de mais de uma exodontia, tanto no grupo C, quanto no R, somente um dente por paciente teve material coletado para posterior análise (na Tabela 1, os dentes marcados com dois asteriscos), respeitando a proporção de material coletado para todos os indivíduos do grupo, sendo o dente de escolha aquele que tivesse maior extensão radicular preservada no momento da exodontia.

4.2 Avaliação da expressão gênica de fatores locais moduladores da remodelação óssea e da reabsorção radicular

Para determinar se uma possível alteração na expressão de alguns fatores locais estariam relacionados com a retenção prolongada de dentes decíduos, comparou-se a expressão dos componentes do sistema RANKL/RANK/OPG, a partir do ligamento periodontal remanescente ainda aderido à porção radicular dos dentes de ambos grupos estudados.

Inicialmente, foi avaliada a expressão comparativa do RANKL nos grupos C e R. Os dados mostraram uma diferença estatisticamente significativa do RANKL entre os grupos ($p=0,023$). Foi observada uma menor expressão gênica do RANKL no grupo R quando comparado ao grupo C, indicando um menor potencial de formação de osteoclastos nesse grupo (Figura 3). A expressão gênica relativa do RANKL foi de $26,41 \pm 9,56$ no grupo C e de $11,76 \pm 4,92$ no grupo R.

Sabendo que o RANKL atua modulando a osteoclastogênese, ao se ligar e ativar o receptor RANK, em seguida foi avaliada a expressão de RANK no material aderido à raiz dos dentes decíduos. A Figura 4 mostra que a expressão do receptor do RANKL, o RANK, com expressão gênica relativa de $12,34 \pm 2,71$ no grupo C e $5,45 \pm 1,29$ no grupo R, foi menor no grupo R quando comparada ao grupo C, embora essa menor expressão não tenha sido estatisticamente significativa ($p=0,438$).

Figura 3 - Representação gráfica da expressão relativa de RANKL nos tecidos aderidos às raízes dos dentes decíduos extraídos dos grupos controle (C) e com retenção (R), avaliados por qPCR. Valores indicam a média $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, indica diferença em relação ao grupo C, pelo teste de Mann-Whitney.

Figura 4 - Representação gráfica da expressão relativa de RANK nos tecidos aderidos às raízes dos dentes decíduos extraídos dos grupos controle (C) e com retenção (R), avaliados por qPCR e pelo teste de Mann-Whitney. Valores indicam a média $\pm$ SEM.

Considerando que a OPG é um importante modulador da ligação RANKL-RANK e que alterações na expressão de OPG poderiam interferir no efeito da redução de RANKL e RANK nos dentes dos indivíduos do grupo R, o próximo passo foi avaliar a expressão de OPG nos dois grupos estudados. A análise por qPCR revelou que os grupos C e R apresentaram mesmo nível de expressão de mRNA para OPG ($p = 0,976$), Figura 5, sendo que as expressões gênicas relativas foram de $1,46 \pm 0,68$ para o grupo C e $1,33 \pm 0,75$ para o grupo R.

Assim, com relação ao sistema RANKL/RANK/OPG, houve redução na expressão tanto do RANKL quanto do RANK, embora somente tenha sido observada diferença estatisticamente significativa para RANKL. Esta redução é um indicativo de que uma possível falha na reabsorção alveolar seria devido a uma redução da via de sinalização RANKL-RANK, o que prejudicaria a diferenciação osteoclástica e consequentemente o processo de reabsorção, e não devido a uma maior quantidade de OPG, que impedisse a ligação do RANKL ao RANK e a formação da cascata de eventos que leva à diferenciação dos osteoclastos.

Figura 5 - Representação gráfica da expressão relativa de OPG nos tecidos aderidos às raízes dos dentes decíduos extraídos dos grupos controle (C) e com retenção (R), avaliados por qPCR e pelo teste de Mann-Whitney. Valores indicam a média $\pm$ SEM.

A literatura já demonstrou que, para que ocorram os eventos celulares relacionados ao sistema RANKL/RANK/OPG, é necessário que sejam recrutadas células mononucleares, que poderão se diferenciar em osteoclastos.

Desta forma, avaliou-se então a expressão da MCP-1, um componente importante para que esse recrutamento ocorra (Figura 6). Os dados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de MCP-1 relativa ao tecido aderido às raízes dos dentes dos grupos C e R. Ambos os grupos apresentaram valores de MCP-1 semelhantes, com expressão gênica relativa de $0,94 \pm 0,22$ no grupo C e $1,26 \pm 0,55$ no grupo R. Desta forma, a expressão desta quimiocina não pode justificar uma possível discrepância em sua ação no recrutamento de pré-osteoclastos, que interferissem assim na formação dos osteoclastos.

Figura 6 - Representação gráfica da expressão relativa de MCP-1 nos tecidos aderidos às raízes dos dentes decíduos extraídos dos grupos controle (C) e com retenção (R), avaliados por qPCR e pelo teste de Mann-Whitney. Valores indicam a média $\pm$ SEM.

Considerando ainda que a remodelação óssea é um processo metabólico caracterizado por um equilíbrio preciso entre a atividade de osteoclastos e osteoblastos, voltou-se a análise para os osteoblastos, que também estão envolvidos na osteoclastogênese, uma vez que expressam RANKL.

Nesta etapa, selecionou-se um fator de transcrição chave para os osteoblastos, o RUNX2. A avaliação do RUNX2, que poderia indicar se haveria alguma alteração na diferenciação dessas células blásticas, não mostrou diferenças significantes entre os grupos C e R (Figura 7) e teve sua expressão gênica relativa de $4,87 \pm 0,91$ para o grupo C e de $4,35 \pm 1,81$ para o grupo R.

Figura 7 - Representação gráfica da expressão relativa de RUNX2 nos tecidos aderidos às raízes dos dentes decíduos extraídos dos grupos controle (C) e com retenção (R), avaliados por qPCR e pelo teste de Mann-Whitney. Valores indicam a média $\pm$ SEM.

4.3 Avaliação de fatores sistêmicos como possíveis moduladores da remodelação óssea e da reabsorção radicular

Após a análise dos fatores de ação local, passou-se então para a dos fatores de ação sistêmica. A hipótese testada foi se esses fatores teriam alguma influência na questão pesquisada, a retenção prolongada de dentes decíduos, e se haveria alguma associação com os fatores locais primeiramente analisados. Quanto aos componentes de ação sistêmica que podem interferir no metabolismo ósseo, foram analisados a vitamina D, o PTH e IGF-I.

Pelos dados deste trabalho, os níveis séricos de vitamina D mostraram-se reduzidos no grupo R ($25,22 \pm 1,76$ ng/mL), quando em comparação com o grupo C ($30,41 \pm 1,92$ ng/mL). Contudo, o grupo R apresentou um valor médio de vitamina D que não foi significativo sob o ponto de vista estatístico em relação ao grupo C, $p=0,0572$ (Figura 8), embora o valor tenha sido próximo da significância.

Figura 8 – Representação gráfica dos níveis séricos de vitamina D avaliados em indivíduos controles e do grupo com retenção de dentes decíduos. Análise realizada com o teste t de Student, $p=0,0572$. Valores indicam a média $\pm$ SEM.

Os níveis séricos de vitamina D (25(OH)D), bem como o IMC para cada indivíduo, são mostrados na Tabela 2. É possível observar que 21,43% dos indivíduos do grupo R apresentaram deficiência de vitamina D (<20 ng/mL)^{88,89}, enquanto no grupo C não foi detectado nenhum caso de deficiência dessa vitamina. É válido

ressaltar também que, dentre os integrantes do grupo R, houve ainda 2 que apresentaram valores séricos de vitamina D praticamente no limite de deficiência, 20,5 e 20,7ng/mL. Com relação ao IMC dos pacientes, não foi verificada correlação entre níveis de vitamina D e IMC.

Tabela 2: Níveis séricos de vitamina D nos grupos C e R.

Grupo C				Grupo R			
Indivíduo	Sexo	IMC	25(OH)D (ng/mL)	Indivíduo	Sexo	IMC	25(OH)D (ng/mL)
1	F	25,04	24	1	M	14,92	31,1
2	F	21,89	32,8	2	F	15,98	31
3	M	18,74	48,2	3	F	22,02	20,7*
4	M	15,31	35,2	4	M	16,92	20,5*
5	F	27,53	36,5	5	F	17,50	14,2**
6	F	25,03	28,4	6	M	24,62	24,7
7	M	15,46	35,6	7	M	18,35	16,1**
8	M	18,34	33,4	8	M	16,84	30
9	M	18,64	27,7	9	F	22,28	23,3
10	M	14,54	21,9	10	M	18,31	37,4
11	F	16,67	24,7	11	M	15,67	26
12	M	21,65	22,5	12	F	22,39	30,3
13	M	17,44	30,1	13	F	13,71	19,2**
14	M	15,51	24,7	14	F	14,37	28,6

*: Valores de níveis séricos de vitamina D próximos do referencial de deficiência.

**: Deficiência de vitamina D.

Continuando a análise de componentes hormonais, para uma visão mais abrangente das características dos grupos C e R, avaliou-se o paratormônio, que além de atuar na homeostase de cálcio, estimula a ação do RANKL pelos osteoblastos. Tendo também em vista que vitamina D e PTH apresentam relação inversa de seus níveis séricos, buscou-se avaliar então como estariam os níveis séricos do PTH nos indivíduos do estudo.

Os dados do gráfico da Figura 9 mostram que o grupo R apresentou uma média dos valores séricos de PTH maior ($42,36 \pm 5,50$ pg/mL) do que o grupo C ($37,18 \pm 4,13$ pg/mL). Contudo, esses valores não foram significativamente diferentes do ponto de vista estatístico, com $p=0,4573$. Dessa forma, esses dados não mostraram relação entre PTH e estimulação do RANKL. Porém, é possível observar uma tendência de elevação do PTH no grupo R, o que estaria inclusive em consonância com o declínio de vitamina D observado nesse mesmo grupo.

Figura 9 – Representação gráfica dos níveis séricos de PTH avaliados em indivíduos controles e do grupo com retenção de dentes decíduos. Análise realizada com o teste t de Student, $p=0,4573$. Valores indicam a média $\pm$ SEM.

Por fim, avaliou-se outro hormônio que assim como o PTH também estimula osteoblastos e é ativo na remodelação óssea, o IGF-I, um fator interessante para ser estudado nos casos observados, visto que seu potencial de estimulação osteoblástica pode levar ao aumento da expressão de RANKL. Observou-se que os níveis de IGF-I séricos em pacientes do grupo C ($303,10 \pm 42,23$ ng/mL) e do grupo R ($332,20 \pm 53,43$ ng/mL) foram semelhantes. Desta forma, esses dados mostram que a avaliação do IGF-I não apresentou dados que pudessem estar relacionados à retenção prolongada de dentes decíduos neste estudo (Figura 10).

Figura 10 – Representação gráfica dos níveis séricos de IGF-I avaliados em indivíduos controles e do grupo com retenção de dentes decíduos. Análise realizada com o teste t de Student, $p=0,6670$. Valores indicam a média $\pm$ SEM.

5 Discussão

A erupção dental humana é um processo de desenvolvimento único no organismo. O mecanismo pelo qual ocorre nunca foi totalmente compreendido e a literatura científica no campo é extremamente esparsa. Pela dificuldade, e muitas vezes impossibilidade, de se realizarem estudos histológicos e imunoistoquímicos do folículo dental humano, as pesquisas trazem estudos focados na comparação entre patologias e situações de normalidade relacionadas à erupção dental². E esta é a linha seguida na abordagem deste trabalho, no qual foram comparados indivíduos com uma alteração da normalidade, a retenção prolongada de dentes decíduos, e indivíduos sem essa condição.

Já está bem compreendido que o sistema RANKL/RANK/OPG regula o metabolismo ósseo, o que faz ao exercer efeitos biológicos nas células clásticas, tanto na reabsorção óssea, quanto na rizólise¹⁵. Para a necessária diferenciação dessas células, que irão reabsorver os tecidos ósseo e radicular, o RANKL deve se ligar ao RANK^{21,90}; enquanto isso, a OPG inibe esse processo ligando-se ao RANKL, o que regula negativamente a osteoclastogênese^{21,30,91,92}. Procurou-se então neste estudo, averiguar se haveria disparidades entre os componentes desse mecanismo de reabsorção entre os grupos C e R. Ao serem avaliadas as expressões gênicas do RANKL, do RANK e da OPG, não se observaram diferenças entre os grupos para a OPG (Figura 5), mas foi observada uma menor expressão de RANKL e RANK nos tecidos aderidos aos dentes decíduos dos pacientes do grupo R, em relação ao grupo C (Figuras 3 e 4).

Após a ligação do RANKL ao RANK, ocorre o recrutamento de moléculas adaptadoras, sendo que a principal relacionada à osteoclastogênese é o fator 6 associado a receptor de TNF (TRAF6)^{21,90}, que atua como adaptador chave para reunir proteínas de sinalização intracelular^{91,93}, como as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), a proteína quinase B (Akt) e o fator nuclear de células T ativadas dependentes de calcineurina 1 (NFATc1)⁹³, que direcionam a expressão de genes osteoclasto-específicos. Estes genes então são expressos em diferentes fases da osteoclastogênese, levando à diferenciação e à ativação dos osteoclastos⁹¹. No presente estudo, foi observado que no grupo R houve uma expressão de RANKL menor quando comparada à do grupo C, bem como de RANK, embora este último não

tenha sido significativa estatisticamente. Essa menor expressão gênica de RANKL e RANK poderia explicar uma consequente menor diferenciação de osteoclastos e assim uma menor reabsorção óssea/radicular. Os dados do presente estudo sugerem que esta menor diferenciação de osteoclastos explicaria a permanência prolongada dos dentes decíduos à cavidade bucal, já que nesse caso haveria prejuízo na formação da via de erupção.

Considerando que foi observada uma menor expressão de RANKL e RANK no grupo R e que durante a formação da via de erupção a remoção do osso sobrejacente ao dente permanente é essencial para esse processo ocorrer, o menor recrutamento de monócitos para a região a ser reabsorvida poderia desempenhar um papel relevante nesta falha de osteoclastogênese. Nesse sentido, a MCP-1 atua como uma quimiocina chave para o recrutamento de monócitos^{18,39}, associada à osteoclastogênese¹⁸: atrai pré-osteoclastos ao sítio de sinalização do RANKL, que se fundem e formam osteoclastos multinucleados. Assim, a MCP-1 estimula indiretamente a osteoclastogênese⁴⁴. Estudos mostram que a relação *in vitro* entre MCP-1 e RANKL mostra que quando a sinalização deste é bloqueada, a expressão da MCP-1 é regulada negativamente⁹⁴ e, quando há ausência da quimiocina, ocorre uma diminuição quanto aos osteoclastos formados^{10,44,93,95}, o que mostra a função necessária desempenhada pela MCP-1 para a formação dessas células clásticas^{10,93}. Além disso, a adição de MCP-1 exógena não somente aumenta o número de osteoclastos, como também recupera a inibição da formação dessas células em camundongos sem MCP-1, quando testados *in vitro*⁴⁴. Nesta pesquisa, esta quimiocina também não apresentou diferenças entre os grupos C e R (Figura 6) que justificassem a hipótese de falha no recrutamento de células mononucleares para a posterior formação de osteoclastos.

A osteoclastogênese já explicada também traz uma importante assertiva: a de que os osteoblastos são essenciais para a diferenciação dos osteoclastos. Enquanto os osteoblastos expressam o RANKL como um fator associado à membrana, os pré-osteoclastos, que expressam RANK, reconhecem o RANKL pela interação célula-célula e diferenciam-se em osteoclastos¹⁷. A partir deste fato, tem importante papel então o RUNX2, fator essencial para induzir a diferenciação osteoblástica^{17,52,96-100}. O processo completo de diferenciação de células tronco mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ocorre em diferentes fases, sendo que cada uma delas é caracterizada por um padrão particular de expressão de genes marcadores de

osteoblastos. O RUNX2 é o fator de transcrição que controla essa expressão gênica, o que ocorre por ligação ao sítio de ligação ao RUNX2, OSE2, encontrado na região promotora de todos os principais genes marcadores de osteoblastos⁵⁶. Como principal regulador tanto da diferenciação, quanto da função osteoblástica^{50,51,56,101}, o RUNX2 regula a diferenciação positivamente nos estágios iniciais, em que é formado osso imaturo de baixa mineralização^{50,52,53,56,102}, e negativamente nos estágios tardios^{50,53,56}, devendo então ser suprimido para formação de osso maduro com alta mineralização^{52,102}.

Sobre o papel do RUNX2 na reabsorção, trabalhos mostram que uma expressão aumentada desse fator nos osteoblastos resulta em diferenciação osteoclástica aumentada de co-culturas de pré-osteoclastos *in vitro*^{103,104} e em uma exagerada reabsorção óssea *in vivo*^{103,105}. Então o Runx2 promove tanto osteoblastogênese, quanto osteoclastogênese dirigida por osteoblastos, e já foi inclusive reportado que, em culturas primárias de osteoblastos, o RUNX2 influencia o RANKL, ao regular sua associação com a membrana celular¹⁰¹. Entretanto, este importante fator para o metabolismo ósseo não mostrou discrepâncias entre os grupos pesquisados (Figura 7), nem relação com os dados obtidos sobre o RANKL.

Quanto aos fatores de ação hormonal, a vitamina D é de grande importância para o desenvolvimento e a manutenção dos ossos¹⁰⁶, sendo associada com alta massa óssea e diminuído risco de fratura⁶⁰. Experimentos *in vivo* já demonstraram que níveis adequados de vitamina D reduzem a expressão de RANKL, a osteoclastogênese e mantêm níveis ótimos de volume trabecular ósseo¹⁰⁷. Além disso, a vitamina D se liga ao VDR, que estimula a absorção de cálcio intestinal e a reabsorção renal, prevenindo assim a liberação de cálcio de seu estoque no osso para o soro¹⁰⁸, o que favorece a manutenção óssea^{106,109,110}.

Os efeitos benéficos da vitamina D na homeostase óssea então já estão comprovados, inclusive para terapêutica contra osteoporose, viabilizando o aumento da densidade mineral óssea nesses pacientes¹¹¹. Porém, há evidências que demonstram a capacidade da vitamina D atuar, via seu receptor, para mediar efeitos negativos no osso^{108,112}. Em contraposição à ação de manutenção óssea¹⁰⁸, a forma mais ativa, 1,25(OH)₂D₃, é um dos mais potentes indutores do RANKL *in vitro*¹¹³ e induz a reabsorção óssea^{109,111}, assim como a forma ativa 25(OH)D₃^{59,108,112,114}. Sabendo-se que células osteoblásticas tratadas com 1,25(OH)₂D₃ estimulam a expressão de RANKL, que então induz a osteoclastogênese¹¹¹, tem-se que as ações

moleculares da vitamina D no osso são portanto complexas⁶⁰, havendo diferenças nos efeitos *in vivo* e *in vitro*^{106,108,111,112}. Dessa forma, futuros estudos devem ser feitos para elucidar essa discrepância observada¹¹¹.

Os achados na literatura que indicam a vitamina D como estimuladora do RANKL, e assim da reabsorção óssea^{108,109,111-115}, são interessantes para esta pesquisa. Embora não tenha havido neste trabalho resultado significativo para a diferença nos níveis de vitamina D entre os grupos C e R, o resultado foi próximo do nível de significância, com $p=0,0572$, sendo que os valores de vitamina D se apresentaram em geral menores para o grupo R (Figura 8). Além disso, houve indivíduos, no grupo R, que apresentaram valores inferiores a 20 ng/mL (Tabela2), ou seja, considerados deficientes de vitamina D^{88,89}.

Quanto à deficiência de vitamina D, é um assunto controverso. Enquanto há fontes que defendem valores de níveis séricos abaixo de 20ng/mL como indicativos de deficiência dessa vitamina, como a Sociedade Americana de Endocrinologia Pediátrica⁸⁸ e a Sociedade Brasileira de Pediatria⁸⁹, há outras que defendem valores abaixo de 30ng/mL como indicativos de deficiência^{116,117}. Neste estudo, utilizamos a indicação preconizada pela Sociedade Brasileira de Pediatria⁸⁹ e Pela Sociedade Americana de Endocrinologia Pediátrica⁸⁸.

Com relação aos dados obtidos, é possível atribuir o resultado não estatisticamente significativo da vitamina D ao número reduzido da amostra, uma limitação deste trabalho. Porém, como houve um resultado significativo para RANKL, sendo que este apresentou menor expressão gênica no grupo de indivíduos com retenção prolongada de dentes decíduos, grupo R, esse dado nos leva a considerar ser possível que níveis séricos reduzidos de vitamina D possam implicar em uma estimulação reduzida de RANKL por essa vitamina, o que diminuiria, por conseguinte, a diferenciação osteoclástica e a reabsorção óssea alveolar.

Ainda com relação aos fatores sistêmicos, o PTH, polipeptídeo secretado pelas glândulas paratireoides em resposta às quedas séricas de cálcio^{69,118,119}, atua principalmente nos rins e nos ossos, nos quais estimula respectivamente a reabsorção e a liberação de cálcio^{118,120}, configurando-se assim em um hormônio essencial para manutenção da homeostasia desse mineral. Embora a vitamina D seja a única que estimule a absorção de cálcio intestinal, trabalha em conjunto com o PTH para mobilizar o cálcio do osso e conservar o da urina^{109,111}. O paratormônio e a vitamina D apresentam níveis séricos em relação inversa, visto que a deficiência da vitamina D

resulta em aumento da secreção do PTH para manter a homeostasia de cálcio¹²¹, enquanto em situações de suplementação de vitamina D, caem os níveis plasmáticos de PTH^{122,123}. Neste trabalho, foi possível observar uma tendência de aumento nos níveis séricos de PTH no grupo R (Figura 9), o que poderia estar em consonância com a redução de vitamina D observada nesse mesmo grupo (Figura 8).

Ainda sobre a correlação do PTH com os ossos, este hormônio estimula tanto formação quanto reabsorção ósseas, sendo que a duração e a periodicidade de exposição ao PTH é que governam seus efeitos anabólicos ou catabólicos^{120,124-126}: estudos demonstram que exposição intermitente ao PTH leva ao aumento da formação óssea, enquanto a administração contínua leva à reabsorção^{125,126}. Exemplo do efeito anabólico é o fato do paratormônio ser utilizado para tratamento da osteoporose, em administrações intermitentes, causando formação óssea por sua capacidade de estimular a osteoblastogênese e a sobrevivência de osteoblastos^{68,69,120,127}. Esse anabolismo ósseo induzido pelo PTH pode ser explicado pelo seu potencial em regular negativamente a expressão da esclerostina^{125,126}, proteína codificada pelo gene SOST, expressa e secretada por osteócitos, que é potente inibidora da formação óssea realizada por osteoblastos^{119,128}.

Paradoxalmente a isso, os efeitos catabólicos do PTH podem ser explicados pela sinalização do PTHrP em osteoblastos e osteócitos ser capaz de aumentar a proporção de RANKL em relação à de OPG e assim estimular a reabsorção óssea^{124,126,128}. Desta forma, frente ao duplo papel do paratormônio na remodelação óssea, futuros estudos são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais ele atua em vias moleculares¹²⁶. Já com relação aos resultados deste estudo, não foram demonstradas diferenças quanto aos níveis de PTH dentre os grupos, que pudessem indicar alguma interferência no padrão de reabsorção radicular fisiológica (Figura 9), embora a tendência de aumento no grupo R mereça ser ressaltada.

O PTH também apresenta relação com o IGF-I, sendo que o paratormônio estimula a produção de IGF-I por osteoblastos. Os dois hormônios (PTH e IGF-I) são sinérgicos entre si, devido às ações anabólicas do PTH envolverem, juntamente com a inibição de antagonistas, como a esclerostina anteriormente mencionada, também efeitos indiretos mediados pela ativação do IGF-I, de forma que elevações nos níveis séricos de IGF-I estimulam as ações do PTH no osso^{72,129,130}. Neste trabalho, porém, não houve dados que pudessem indicar ações entre PTH e IGF-I relacionadas aos casos estudados de retenção prolongada de dentes decíduos.

Quanto ao IGF-I, não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos C e R desta pesquisa (Figura 10). Esse hormônio é conhecido por atuar a favor da resistência dos ossos, sendo uma das substâncias mais abundantes da matriz óssea que circula sistematicamente e é também secretado localmente, tendo relação direta com a densidade mineral óssea^{73,131}. A deficiência de IGF-I pode levar a desordens metabólicas (como anormalidades lipídicas, resistência à insulina) e à densidade óssea diminuída⁷². Tal hormônio produz um microambiente osteogênico ao induzir a diferenciação de células tronco mesenquimais, estreitando a relação entre reabsorção e formação ósseas, por participar do ciclo de remodelação: o IGF-I é liberado da matriz óssea em resposta à reabsorção osteoclástica, induz a diferenciação de células tronco mesenquimais e estimula a função dos osteoblastos, que por sua vez estimulam a expressão e a secreção do RANKL⁷³.

Portanto, o papel do IGF-I na promoção da formação óssea é por suas ações em células da linhagem osteoblástica, embora sua sinalização também influencie os osteoclastos em número e função. Dados na literatura mostram que camundongos nos quais a produção de IGF-I foi suprimida de todas as células são deficientes na formação e na reabsorção ósseas, com poucos osteoblastos e osteoclastos no osso *in vivo*, com reduzidas unidades formadoras de colônias de osteoblastos e com incapacidade de pré-osteoblastos ou osteoclastos para suportar a osteoclastogênese *in vitro*¹³², já que a expressão do RANKL é prejudicada em osteoblastos quando em ausência de IGF-I¹³¹. Embora neste trabalho tenha sido encontrada uma diminuição na expressão gênica do RANKL no grupo R quando comparado ao grupo C, tal resultado não pode ser relacionado ao IGF-I neste estudo.

Conclusão

6 Conclusão

Com base nos dados deste estudo, sugere-se que é possível menores expressões gênicas de RANKL e RANK estarem envolvidas na permanência de dentes decíduos à cavidade bucal além de seu tempo normal de esfoliação, e que essas alterações quanto ao RANKL e RANK possam estar relacionadas com baixos níveis séricos de vitamina D.

Estudos futuros, com um maior número amostral, devem ser realizados para verificar a possível relação entre vitamina D, RANKL, RANK e retenção prolongada de dentes decíduos.

Referências

Referências

- 1 Harokopakis-Hajishengallis E. Physiologic root resorption in primary teeth: molecular and histological events. *J Oral Sci.* 2007;49(1):1-12.

- 2 Kjaer I. Mechanism of human tooth eruption: review article including a new theory for future studies on the eruption process. *Scientifica (Cairo).* 2014;2014:1-13.

- 3 Maltha JC. Mechanisms of tooth eruption. *Ned Tijdschr Tandheelkd.* 2014;121(4):209-14.

- 4 Aktan AM, Kara I, Sener I, Bereket C, Çelik S, Kirtay M, et al. An evaluation of factors associated with persistent primary teeth. *Eur J Orthod.* 2012;34(2):208-12.

- 5 Must A, Phillips SM, Tybor DJ, Lividini K, Hayes C. The association between childhood obesity and tooth eruption. *Obesity (Silver Spring).* 2012;20(10):2070-4.

- 6 Kutesa A, Nkamba EM, Muwazi L, Buwembo W, Rwenyonyi CM. Weight, height and eruption times of permanent teeth of children aged 4-15 years in Kampala, Uganda. *BMC Oral Health.* 2013;13(15):1-8.

- 7 Dreyer CW, Pierce AM, Lindskog S. Hypothermic insult to the periodontium: a model for the study of aseptic tooth resorption. *Endod Dent Traumatol.* 2000;16(1):9-15.

- 8 Wise GE, Yao S, Zhang Q, Ren Y. Inhibition of osteoclastogenesis by the secretion of osteoprotegerin in vitro by rat dental follicle cells and its implications for tooth eruption. *Arch Oral Biol.* 2002;47(3):247-54.

- 9 Khan UA, Hashimi SM, Khan S, Quan J, Bakr MM, Forwood MR, et al. Differential expression of chemokines, chemokine receptors and proteinases by foreign body giant cells (FBGCs) and osteoclasts. *J Cell Biochem.* 2014;115(7):1290-8.

- 10 Khan UA, Hashimi SM, Bakr MM, Forwood MR, Morrison NA. CCL2 and CCR2 are essential for the formation of osteoclasts and foreign body giant cells. *J Cell Biochem.* 2016;117(2):382-9.

- 11 Fukushima H, Kajiya H, Takada K, Okamoto F, Okabe K. Expression and role of RANKL in periodontal ligament cells during physiological root-resorption in human deciduous teeth. *Eur J Oral Sci.* 2003;111(4):346-52.

- 12 Tsuchiya M, Akiba Y, Takahashi I, Sasano Y, Kashiwazaki J, Tsuchiya S, et al. Comparison of expression patterns of cathepsin K and MMP-9 in odontoclasts and osteoclasts in physiological root resorption in the rat molar. *Arch Histol Cytol.* 2008;71(2):89-100.
- 13 Duan X, Yang T, Zhang Y, Wen X, Xue Y, Zhou M. Odontoblast-like MDPC-23 cells function as odontoclasts with RANKL/M-CSF induction. *Arch Oral Biol.* 2013;58(3):272-8.
- 14 Wang Z, McCauley LK. Osteoclasts and odontoclasts: signaling pathways to development and disease. *Oral Dis.* 2011;17(2):129-42.
- 15 Tyrovola JB, Odont XX. The "Mechanostat Theory" of Frost and the OPG/RANKL/RANK system. *J Cell Biochem.* 2015;116(12):2724-9.
- 16 Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem.* 2010, 13;285(33):25103-8.
- 17 Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* 2002;8(3):147-59.
- 18 Graves DT, Alsulaimani F, Ding Y, Marks Jr SC. Developmentally regulated monocyte recruitment and bone resorption are modulated by functional deletion of the monocytic chemoattractant protein-1 gene. *Bone.* 2002;31(2):282-7.
- 19 Yao S, Pan F, Wise GE. Chronological gene expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in the stellate reticulum of the rat: implications for tooth eruption. *Arch Oral Biol.* 2007;52(3):228-32
- 20 Wise GE. Cellular and molecular basis of tooth eruption. *Orthod Craniofac Res* 2009;12:67–73.
- 21 Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473(2):139-46.
- 22 Wise GE, He H, Gutierrez DL, Ring S, Yao S. Requirement of alveolar bone formation for eruption of rat molars. *Eur J Oral Sci.* 2011;119(5):333-8.

- 23 Dorotheou D, Gkantidis N, Karamolegkou M, Kalyvas D, Kiliaridis S, Kitraki E. Tooth eruption: altered gene expression in the dental follicle of patients with cleidocranial dysplasia. *Orthod Craniofac Res*. 2013;16(1):20-7.
- 24 Yao S, Ring S, Henk WG, Wise GE. In vivo expression of RANKL in the rat dental follicle as determined by laser capture microdissection. *Arch Oral Biol*. 2004;49(6):451-6.
- 25 Wise GE, Lumpkin SJ, Huang H, Zhang Q. Osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor in tooth eruption. *J Dent Res*. 2000;79(12):1937-42.
- 26 Wise GE, Yao S, Odgren PR, Pan F. CSF-1 regulation of osteoclastogenesis for tooth eruption. *J Dent Res*. 2005;84:837–41.
- 27 Wise GE, Frazier-Bowers S, D'Souza R.N. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(4):323-34.
- 28 Liu D, Yao S, Wise GE. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. *Eur J Oral Sci*. 2006;114(1):42-9.
- 29 Chen P, Wei D, Xie B, Ni J, Xuan D, Zhang J. Effect and possible mechanism of network between microRNAs and RUNX2 gene on human dental follicle cells. *J Cell Biochem*. 2014;115(2):340-8.
- 30 Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev*. 2008;29(2):155-92.
- 31 Lossdorfer S, Gotz W, Jager A. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. *Calcif Tissue Int*. 2002;71(1):45-52.
- 32 Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell*. 2000;103(1):41-50.
- 33 Cappellen D, Luong-Nguyen NH, Bongiovanni S, Grenet O, Wanke C, Susa M. Transcriptional program of mouse osteoclast differentiation governed by the

macrophage colony-stimulating factor and the ligand for the receptor activator of NFkappa B. *J Biol Chem.* 2002;277(24):21971-82.

34 Heinrich J, Bsoul S, Barnes J, Woodruff K, Abboud S. CSF-1, RANKL and OPG regulate osteoclastogenesis during murine tooth eruption. *Arch Oral Biol.* 2005;50(10):897-908.

35 Li Y, Toraldo G, Li A, Yang X, Zhang H, Qian WP et al. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood.* 2007;109(9):3839-48.

36 Dufresne SS, Dumont NA, Boulanger-Piette A, Fajardo VA, Gamu D, Kake-Guena SA, et al. Muscle RANK is a key regulator of calcium storage, SERCA activity, and function of fast-twitch skeletal muscles. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016;310(8):C663-72.

37 Yildirim S, Yapar M, Sermet U, Sener K, Kubar A. The role of dental pulp cells in resorption of deciduous teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105(1):113-20.

38 Helfrich MH. Osteoclast diseases and dental abnormalities. *Arch Oral Biol.* 2005;50(2):115-22.

39 Ohba T, Cole HA, Cates JM, Slosky DA, Haro H, Ando T, et al. Bisphosphonates inhibit osteosarcoma-mediated osteolysis via attenuation of tumor expression of MCP-1 and RANKL. *J Bone Miner Res.* 2014;29(6):1431-45.

40 Kim MS, Day CJ, Selinger CI, Magno CL, Stephens SR, Morrison NA. MCP-1 induced human osteoclast-like cells are tartrate-resistant acid phosphatase, NFATc1, and calcitonin receptor-positive but require receptor activator of NFkappaB ligand for bone resorption. *J Biol Chem.* 2006;281(2):1274-85.

41 Toh K, Kukita T, Wu Z, Kukita A, Sandra F, Tang QY, et al. Possible involvement of MIP-1a in the recruitment of osteoclast progenitors to the distal tibia in rats with adjuvant-induced arthritis. *Lab Invest.* 2004;84(9):1092-102.

42 Athanasou NA. The osteoclast--what's new? *Skeletal Radiol.* 2011;40(9):1137-40.

- 43 Liu Z, Xu J, Li H, Zheng Y, He J, Liu H, et al. Bone marrow stromal cells derived MCP-1 reverses the inhibitory effects of multiple myeloma cells on osteoclastogenesis by upregulating the RANK expression. *PLoS One*. 2013;8(12):1-13.
- 44 Miyamoto K, Ninomiya K, Sonoda KH, Miyauchi Y, Hoshi H, Iwasaki R, et al. MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;383(3):373-7.
- 45 Goto KT, Kajiya H, Nemoto T, Tsutsumi T, Tsuzuki T, Sato H, et al. Hyperocclusion stimulates osteoclastogenesis via CCL2 expression. *J Dent Res*. 2011;90(6):793-8.
- 46 Ducy, P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn*. 2000;219(4):461-71.
- 47 Weinstein RS, Chen JR, Powers CC, Stewart SA, Landes RD, Bellido T, et al. Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest*. 2002;109(8):1041-8.
- 48 Lian JB, Stein GS. Runx2/Cbfa1: a multifunctional regulator of bone formation. *Curr Pharm Des*. 2003;9(32):2677-85.
- 49 Van Wijnen AJ, Stein GS, Gergen JP, Groner Y, Hiebert SW, Ito Y, et al. Nomenclature for Runt-related (RUNX) proteins. *Oncogene*. 2004;23(24):4209-10.
- 50 Liu TM, Lee EH. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013;19(3):254-63.
- 51 Vimalraj S, Arumugam B, Miranda PJ, Selvamurugan N. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *Int J Biol Macromol*. 2015;78:202-8.
- 52 Komori T. Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci*. 2008;13:898-903.
- 53 Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):189-95.
- 54 Komori T. Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. *J Cell Biochem*. 2002;87(1):1-8.

55 Komori T. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J Cell Biochem.* 2005;95(3):445-53.

56 Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater.* 2014;28:269-86.

57 Enomoto H, Shiojiria S, Hoshic K, Furuichia T, Fukuyama R, Yoshida C, et al. Induction of osteoclast differentiation by Runx2 through receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin regulation and partial rescue of osteoclastogenesis in Runx2 $^{-/-}$ mice by RANKL transgene. *J Biol Chem.* 2003;278(26):23971-7.

58 Anderson PH, Turner AG, Morris HA. Vitamin D actions to regulate calcium and skeletal homeostasis. *Clin Biochem.* 2012;45(12):880-6.

59 Mabey T, Honsawek S. Role of vitamin D in osteoarthritis: molecular, cellular, and clinical perspectives. *Int J Endocrinol.* 2015;2015:1-14.

60 Turner AG, Hanrath MA, Morris HA, Atkins GJ, Anderson PH. The local production of 1,25(OH) $_2$ D $_3$ promotes osteoblast and osteocyte maturation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;144:114-8.

61 Goltzman D, Hendy GN, White JH. Vitamin D and its receptor during late development. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1849(2):171-80.

62 Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Identification of the vitamin D receptor in osteoblasts and chondrocytes but not osteoclasts in mouse bone. *J Bone Miner Res.* 2014;29(3):685-92.

63 Baldock PA, Thomas GP, Hodge JM, Baker SU, Dressel U, O'Loughlin PD, et al. Vitamin D action and regulation of bone remodeling: suppression of osteoclastogenesis by the mature osteoblast. *J Bone Miner Res.* 2006;21(10):1618-26.

64 van Driel M, Koedam M, Buurman CJ, Roelse M, Weyts F, Chiba H, et al. Evidence that both 1 α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$ and 24-hydroxylated D $_3$ enhance human osteoblast differentiation and mineralization. *J Cell Biochem.* 2006;99(3):922-35.

65 Kogawa M, Anderson PH, Findlay DM, Morris HA, Atkins GJ. The metabolism of 25-(OH)vitamin D3 by osteoclasts and their precursors regulates the differentiation of osteoclasts. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;121(1-2):277-80.

66 Yang Y, Blair HC, Shapiro IM, Wang B. The proteasome inhibitor carfilzomib suppresses parathyroid hormone-induced osteoclastogenesis through a RANKL-mediated signaling pathway. *J Biol Chem*. 2015;290(27):16918-28.

67 Fukushima H, Jimi E, Kajiya H, Motokawa W, Okabe K. Parathyroid-hormone-related protein induces expression of receptor activator of NF- κ B ligand in human periodontal ligament cells via a cAMP/protein kinase A-independent pathway. *J Dent Res*. 2005;84(4):329-34.

68 Datta NS, Abou-Samra AB. PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell Signal*. 2009 Aug;21(8):1245-54.

69 Augustine M, Horwitz MJ. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein analogs as therapies for osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*. 2013;11(4):400-6.

70 Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*. 2001;344(19):1434-41.

71 Karatoprak C, Kayatas K, Kilicaslan H, Yolbas S, Yazimci NA, Gümüşkemer T, et al. Severe hypercalcemia due to teriparatide. *Indian J Pharmacol*. 2012;44(2):270-1.

72 Elis S, Courtland HW, Wu Y, Rosen CJ, Sun H, Jepsen KJ, et al. Elevated serum levels of IGF-1 are sufficient to establish normal body size and skeletal properties even in the absence of tissue IGF-1. *J Bone Miner Res*. 2010;25(6):1257-66.

73 Crane JL, Cao X. Function of matrix IGF-1 in coupling bone resorption and formation. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92(2):107-15.

74 Feng X, Huang D, Lu X, Feng G, Xing J, Lu J, et al. Insulin-like growth factor 1 can promote proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells via mTOR pathway. *Dev Growth Differ*. 2014;56(9):615-24.

75 Walsh S, Jefferiss CM, Stewart K, Beresford JN. IGF-I does not affect the proliferation or early osteogenic differentiation of human marrow stromal cells. *Bone*. 2003;33(1):80-9.

76 Tahimic CG, Wang Y, Bikle DD. Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4(6):1-14.

77 Sheng MH, Lau KH, Baylink DJ. Role of osteocyte-derived insulin-like growth factor I in developmental growth, modeling, remodeling, and regeneration of the bone. *J Bone Metab*. 2014;21(1):41-54.

78 Robinson S, Chan MF. New teeth from old: treatment options for retained primary teeth. *Br Dent J*. 2009;207(7):315-20.

79 American Dental Association. Primary Teeth Eruption Chart. 2012. Disponível em: <http://www.mouthhealthy.org/en/az-topics/e/eruption-charts>. Acessado em 2 de dezembro de 2014.

80 World Health Organization. Programmes. Child growth standards. BMI for age. Disponível em: http://www.who.int/growthref/who2007_bmi_for_age/en/. Acessado em 24 de janeiro de 2015.

81 Brasil. Ministério da Saúde. Biblioteca Virtual em Saúde. Programa Telessaúde Brasil. Disponível em: <http://www.telessaudebrasil.org.br/apps/calculadoras/?page=7>. Acessado em 24 de janeiro de 2015.

82 Hilgers KK, Akridge M, Scheetz JP, Kinane DE. Childhood obesity and dental development. *Pediatr Dent*. 2006;28(1):18-22.

83 Sánchez-Pérez L, Irigoyen ME, Zepeda M. Dental caries, tooth eruption timing and obesity: a longitudinal study in a group of Mexican schoolchildren. *Acta Odontol Scand*. 2010;68(1):57-64.

84 Costacurta M, Sicuro L, Di Renzo L, Condò R, De Lorenzo A, Docimo R. Childhood obesity and skeletal-dental maturity. *Eur J Paediatr Dent*. 2012;13(2):128-32.

85 Mack KB, Phillips C, Jain N, Koroluk LD. Relationship between body mass index percentile and skeletal maturation and dental development in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2013;143(2):228-34.

86 Hedayati Z, Khalafinejad F. Relationship between body mass index, skeletal maturation and dental development in 6- to 15- year old orthodontic patients in a sample of iranian population. J Dent (Shiraz). 2014;15(4):180-6.

87 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression. Data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402-8.

88 Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M, Drug and Therapeutics Committee of the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. Vitamin D Deficiency in Children and Its Management: Review of Current Knowledge and Recommendations. Pediatrics. 2008;122(2):398-417.

89 Sociedade Brasileira de Pediatria. Departamento de Nutrologia. Documentos científicos. Deficiência de vitamina D em crianças e adolescentes. Disponível em: http://www.sbp.com.br/src/uploads/2015/02/vitamina_d_dcnutrologia2014-2.pdf. Acessado em 7 de junho de 2015.

90 Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. Bone. 2007;40(2):251-64.

91 Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature. 2003;423(6937):337-42.

92 Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. Cytokine Growth Factor Rev. 2004;15(6):457-75.

93 Kim JH, Kim N. Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. Chonnam Med J. 2016;52(1):12-7.

94 Kim MS, Day CJ, Morrison NA. MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation. J Biol Chem. 2005;280(16):16163-9.

95 Sul OJ, Ke K, Kim WK, Kim SH, Lee SC, Kim HJ, et al. Absence of MCP-1 leads to elevated bone mass via impaired actin ring formation. J Cell Physiol. 2012;227(4):1619-27.

- 96 Komori T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *J Cell Biochem.* 2011;112(3):750-5.
- 97 Chen H, Ghori-Javed FY, Rashid H, Serra R, Gutierrez SE, Javed A. Chondrocyte-specific regulatory activity of Runx2 is essential for survival and skeletal development. *Cells Tissues Organs.* 2011;194(2-4):161-5.
- 98 Wei J, Shimazu J, Makinistoglu MP, Maurizi A, Kajimura D, Zong H, et al. Glucose Uptake and Runx2 Synergize to Orchestrate Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell.* 2015;161(7):1576-91.
- 99 Xu J, Li Z, Hou Y, Fang W. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Am J Transl Res.* 2015;7(12):2527-35.
- 100 Thacker G, Kumar Y, Khan MP, Shukla N, Kapoor I, Kanaujiya JK, et al. Skp2 inhibits osteogenesis by promoting ubiquitin-proteasome degradation of Runx2. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(4):510-9.
- 101 Martin A, Xiong J, Koromila T, Ji JS, Chang S, Song YS, et al. Estrogens antagonize RUNX2-mediated osteoblast-driven osteoclastogenesis through regulating RANKL membrane association. *Bone.* 2015;75:96-104.
- 102 Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem.* 2006;99(5):1233-9.
- 103 Geoffroy V, Kneissel M, Fournier B, Boyde A, Matthias P. High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage. *Mol Cell Biol.* 2002;22(17):6222-33.
- 104 Baniwal SK, Shah PK, Shi Y, Haduong JH, Declerck YA, Gabet Y, et al. Runx2 promotes both osteoblastogenesis and novel osteoclastogenic signals in ST2 mesenchymal progenitor cells. *Osteoporos Int.* 2012;23(4):1399-413.
- 105 Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, et al. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol.* 2001;155(1):157-66.
- 106 Yoshida T, Stern PH. How vitamin D works on bone. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2012;41(3):557-69.

107 Lee AM, Sawyer RK, Moore AJ, Morris HA, O'Loughlin PD, Anderson PH. Adequate dietary vitamin D and calcium are both required to reduce bone turnover and increased bone mineral volume. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;144:159-62.

108 Yamamoto Y, Yoshizawa T, Fukuda T, Shirode-Fukuda Y, Yu T, Sekine K, et al. Vitamin D receptor in osteoblasts is a negative regulator of bone mass control. *Endocrinology*. 2013;154(3):1008-20.

109 Suda T, Ueno Y, Fujii K, Shinki T. Vitamin D and bone. *J Cell Biochem*. 2003;88(2):259-66.

110 Allard L, Demoncheaux N, Machuca-Gayet I, Georgess D, Coury-Lucas F, Jurdic P, et al. Biphasic effects of vitamin D and FGF23 on human osteoclast biology. *Calcif Tissue Int*. 2015;97(1):69-79.

111 Takahashi N. Mechanism of inhibitory action of eldecalcitol, an active vitamin D analog, on bone resorption in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2013;136:171-4.

112 Lam NN, Triliana R, Sawyer RK, Atkins GJ, Morris HA, O'Loughlin PD, et al. Vitamin D receptor overexpression in osteoblasts and osteocytes prevents bone loss during vitamin D-deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;144:128-31.

113 Suda T, Takahashi F, Takahashi N. Bone effects of vitamin D - Discrepancies between in vivo and in vitro studies. *Arch Biochem Biophys*. 2012;523(1):22-9.

114 Reinke DC, Kogawa M, Barratt KR, Morris HA, Anderson PH, Atkins GJ. Evidence for altered osteoclastogenesis in splenocyte cultures from Cyp27b1 knockout mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015. pii: S0960-0760(15)30142-4.

115 Nakamichi Y, Takahashi N. Current Topics on Vitamin D. The role of active forms of vitamin D in regulation of bone remodeling. *Clin Calcium*. 2015;25(3):395-402.

116 Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol*. 2009;19(2):73-8.

117 Munns CF, Shaw N, Kiely M, Specker BL, Thacher TD, Ozono K, et al. Global Consensus Recommendations on Prevention and Management of Nutritional Rickets. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(2):394-415.

118 Sneddon WB, Magyar CE, Willick GE, Syme CA, Galbiati F, Bisello A, et al. Ligand-selective dissociation of activation and internalization of the parathyroid hormone (PTH) receptor: conditional efficacy of PTH peptide fragments. *Endocrinology*. 2004;145(6):2815-23.

119 Bellido T, Saini V, Pajevic PD. Effects of PTH on osteocyte function. *Bone*. 2013;54(2):250-7.

120 Esbrit P, Alcaraz MJ. Current perspectives on parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) as bone anabolic therapies. *Biochem Pharmacol*. 2013;85(10):1417-23.

121 Gunnarsson O, Indridason OS, Franzson L, Sigurdsson G. Factors associated with elevated or blunted PTH response in vitamin D insufficient adults. *J Intern Med*. 2009;265(4):488-95.

122 Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev*. 2001;22(4):477-501.

123 Björkman M, Sorva A, Tilvis R. Responses of parathyroid hormone to vitamin D supplementation: a systematic review of clinical trials. *Arch Gerontol Geriatr*. 2009;48(2):160-6.

124 Jilka RL, O'Brien CA, Bartell SM, Weinstein RS, Manolagas SC. Continuous elevation of PTH increases the number of osteoblasts via both osteoclast-dependent and -independent mechanisms. *J Bone Miner Res*. 2010;25(11):2427-37.

125 Silva BC, Costa AG, Cusano NE, Kousteni S, Bilezikian JP. Catabolic and anabolic actions of parathyroid hormone on the skeleton. *J Endocrinol Invest*. 2011;34(10):801-10.

126 Silva BC, Bilezikian JP. Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton. *Curr Opin Pharmacol*. 2015;22:41-50.

127 Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone*. 2007;40(6):1434-46.

128 Ben-awadh AN, Delgado-Calle J, Tu X, Kuhlenschmidt K, Allen MR, Plotkin LI, et al. Parathyroid hormone receptor signaling induces bone resorption in the adult

skeleton by directly regulating the RANKL gene in osteocytes. *Endocrinology*. 2014;155(8):2797-809.

129 Lombardi G, Di Somma C, Vuolo L, Guerra E, Scarano E, Colao A. Role of IGF-I on PTH effects on bone. *J Endocrinol Invest*. 2010;33(7Suppl):22-6.

130 Lombardi G, Di Somma C, Rubino M, Faggiano A, Vuolo L, Guerra E, et al. The roles of parathyroid hormone in bone remodeling: prospects for novel therapeutics. *J Endocrinol Invest*. 2011;34(7Suppl):18-22.

131 Kawai M, Rosen CJ. Insulin-like growth factor-I and bone: lessons from mice and men. *Pediatr Nephrol*. 2009;24(7):1277-85.

132 Bikle DD, Wang Y. Insulin like growth factor-I: a critical mediator of the skeletal response to parathyroid hormone. *Curr Mol Pharmacol*. 2012;5(2):135-42.

Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido para participação na pesquisa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a permitir a participação voluntária de seu(sua) filho(a) na pesquisa “Retenção prolongada de dentes decíduos: possíveis fatores etiológicos locais e sistêmicos”. Neste estudo, pretendemos avaliar possíveis causas para a permanência prolongada dos “dentes de leite” na boca.

O motivo que nos leva a estudar esse assunto é a possibilidade de compreender o porquê de alguns “dentes de leite” não “caírem” durante seu período normal de esfoliação e assim auxiliar uma futura abordagem a pacientes que apresentarem esse caso.

Para este estudo, adotaremos os seguintes procedimentos: será feita uma coleta de sangue, além da coleta do dente já indicado para extração.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido(a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para permitir ou recusar a participação. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que há o atendimento. A pesquisadora irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. O participante estará sujeito ao desconforto decorrente da coleta de sangue, devido à picada da agulha. Este estudo apresenta risco mínimo. Você tem assegurado o direito a ressarcimento ou indenização no caso de quaisquer danos eventualmente produzidos pela pesquisa.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Nome ou material que indique participação não será liberado sem a sua permissão. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com a pesquisadora responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pela pesquisadora responsável e a outra será fornecida a você.

Eu, _____, portador(a) do documento de identidade _____, fui informado(a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão, se assim o desejar. Declaro que concordo com a participação de meu(minha) filho(a) nesse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20____.

Assinatura do(a) participante

Assinatura da pesquisadora

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar: CEP- COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO, USP

FONE: (16) 3315-0493 / E-MAIL: cep@forp.usp.br

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: THAÍS APARECIDA XAVIER

ENDEREÇO: RUA RUI BARBOSA, 790/1402, CENTRO, RIBEIRÃO PRETO SP, 14015120

FONE: (32) 91756427 / E-MAIL: thais.xa@gmail.com

Apêndice B – Termo de assentimento livre e esclarecido para participação na pesquisa

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (No caso do menor entre 12 e 18 anos)

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa “Retenção prolongada de dentes decíduos: possíveis fatores etiológicos locais e sistêmicos”. Nesta pesquisa, pretendemos avaliar possíveis causas para a permanência prolongada dos “dentes de leite” na boca.

O motivo que nos leva a estudar esse assunto é a possibilidade de compreender o porquê de alguns “dentes de leite” não “caírem” durante seu período normal de esfoliação e assim auxiliar uma futura abordagem a pacientes que apresentarem esse caso.

Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: coleta do dente indicado para extração para tratamento e uma coleta de sangue. Para participar desta pesquisa, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido(a) em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se. O responsável por você poderá retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido(a) pela pesquisadora, que irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação. Esta pesquisa apresenta risco mínimo. Apesar disso, você tem assegurado o direito a ressarcimento ou indenização no caso de quaisquer danos eventualmente produzidos pela pesquisa.

Os resultados estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a permissão do responsável por você. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com a pesquisadora responsável por um período de 5 anos e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pela pesquisadora responsável e a outra será fornecida a você.

Eu, _____, portador(a) do documento de identidade _____, fui informado(a) dos objetivos da presente pesquisa, de maneira clara e detalhada. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar dessa pesquisa. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20____.

Assinatura do(a) menor

Assinatura da pesquisadora

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:
CEP- COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO, USP

FONE: (16) 3315-0493 / E-MAIL: cep@forp.usp.br

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: THAÍS APARECIDA XAVIER

ENDEREÇO: RUA RUI BARBOSA, 790/1402, CENTRO, RIBEIRÃO PRETO SP, 14015120

FONE: (32) 91756427 / E-MAIL: thais.xa@gmail.com

Apêndice C – Termo de assentimento para coleta de sangue

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**

TERMO DE ASSENTIMENTO Para coleta de sangue

Pesquisa:

Retenção prolongada de dentes decíduos: possíveis fatores etiológicos locais e sistêmicos

Figura 1: Site hellokids.com

Você sabia que as gotinhas de sangue podem ter informações importantes sobre a saúde? Você está sendo convidado(a) a permitir que seu sangue seja coletado para ser utilizado nessa pesquisa.

Figura 2: Can Stock Photo

Nome do responsável legal: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome do(a) adolescente : _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome da pesquisadora responsável: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Anexo A – Parecer de aprovação do CEP

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Retenção prolongada de dentes decíduos: possíveis fatores etiológicos locais e sistêmicos

Pesquisador: Thaís Aparecida Xavier

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 44249415.0.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.084.058

Data da Relatoria: 29/04/2015

Apresentação do Projeto:

A retenção prolongada de dentes decíduos é um achado recorrente na clínica odontológica. O objetivo deste trabalho é avaliar possíveis fatores locais e sistêmicos relacionados à etiologia do quadro. Para isso, serão coletados 16 dentes decíduos (1 por criança) com retenção prolongada e, 16 dentes sem retenção prolongada, mas com indicação terapêutica de exodontia; serão coletadas, também, amostras sanguíneas dos 32 indivíduos participantes do estudo, além de informações concernentes às anamneses dos mesmos. O material será então analisado para pesquisa dos fatores locais (RANK, RANK L, OPG, RUNX2, MCP1) e sistêmicos (Vitamina D, IGF1, PTHrP).

Objetivo da Pesquisa:

Se seriam os fatores locais (RANK, RANKL, OPG, RUNX2, MCP1) e sistêmicos (Vitamina D, IGF1, PTHrP) relacionados à condição de retenção prolongada de dentes decíduos.

Objetivo Primário:

O presente trabalho tem como objetivo analisar fatores sistêmicos (Vitamina D, IGF1, PTHrP) e locais (RANK, RANKL, OPG, RUNX2, MCP1), correlacionando-os nos casos de impactação dentária dos dentes permanentes e retenção prolongada dos decíduos sucessores além do seu período de esfoliação, a fim de se compreender as possíveis causas desse quadro.

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP**

Continuação do Parecer: 1.084.058

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos são mínimos, os mesmos inerentes às atividades de extração dental e coleta de amostra de sangue.

Benefícios:

Melhor compreensão sobre o quadro de retenção prolongada de dentes decíduos, o que pode direcionar uma melhor abordagem futura aos pacientes com o quadro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A temática proposta é original e importante para a área da saúde humana. O projeto está bem estruturado, com revisão bibliográfica adequada, pertinente ao tema e atualizada. Os pesquisadores apresentam formação acadêmica adequada para desenvolver o projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A temática proposta é original e importante para a área da saúde humana. O projeto está bem estruturado, com revisão bibliográfica adequada, pertinente ao tema e atualizada. Os pesquisadores apresentam formação acadêmica adequada para desenvolver o projeto.

Recomendações:

Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberado na 180ª Sessão Ordinária do CEP, realizada em 27/05/2015.

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 1.084.058

RIBEIRAO PRETO, 28 de Maio de 2015

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

Anexo B – Termo de consentimento livre e esclarecido para coleta de dentes

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
BIOBANCO DE DENTES HUMANOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Biobanco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, convida você _____, natural de _____, nascido em ____/____/____, sexo _____, residente à _____, telefone (____) _____ portador(a) do RG _____, a consentir (concordar) que o(s) dente(s) extraído(s) _____, com grau de irrupção _____ por indicação terapêutica (tratamento), do(a) menor _____, para a melhoria de sua saúde, como documentado em seu prontuário, possa(m) ser coletado(s) e armazenado(s) para ser(em) utilizado(s) pelos alunos desta Faculdade em treinamento(s) pré-clínico(s) e/ou pesquisa(s). O(s) dente(s) será(ão) armazenado(s) individualmente e identificado(s) por códigos, garantindo o seu anonimato. Não sendo de sua vontade concordar com a coleta do(s) dente(s) extraído(s), você não sofrerá nenhum prejuízo ou penalidade. A utilização deste(s) dente(s) em pesquisa(s) deverá ser previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, sendo sua identidade preservada na divulgação.

Solicito que manifeste o seu desejo quanto às seguintes alternativas:

() I- Necessidade de novo consentimento a cada pesquisa

() II- Dispensa de novo consentimento a cada pesquisa

A utilização do(s) dente(s) armazenado(s) será para aprimoramento de técnicas (tipos de tratamentos) e materiais empregados nas diversas áreas da Odontologia. Para conhecimento dos resultados obtidos com a utilização do(s) dente(s) armazenado(s), você poderá entrar em contato com o Biobanco de Dentes Humanos da FORP-USP, localizado à Avenida do Café s/n, bairro Monte Alegre, CEP 14040-904, Ribeirão Preto - SP, telefone (16) 33150274, atendimento de segunda à sexta-feira, das 8h às 12h e das 13h às 17h. Em casos onde houver implicações com os participantes da pesquisa, o Biobanco juntamente com o Comitê de Ética alertarão ao responsável pela pesquisa da necessidade de informar aos participantes da pesquisa a respeito dos resultados obtidos. Os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir de pesquisa(s) poderão ser utilizados em pesquisas futuras. A retirada do consentimento de utilização do(s) dente(s) poderá ser realizada por escrito, a qualquer momento, desde que não tenha ocorrido sua destruição, sem prejuízo(s) ou penalidade(s) em caso de sua desistência. O prazo de armazenamento do(s) dente(s) é indeterminado. Caso ocorra transferência do(s) dente(s) armazenado(s) entre Biobancos, sempre que possível, você será comunicado.

O Comitê de Ética em Pesquisa é um órgão institucional, com o objetivo de avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos, a fim de garantir a dignidade, os direitos, a segurança e o bem-estar do(s) participante(s) da(s) pesquisa(s), localizado à Avenida do Café s/n, bairro Monte Alegre, CEP 14040-904, Ribeirão Preto - SP, telefone (16) 33150251, atendimento de segunda à sexta-feira, das 8h às 12h e das 13h30min às 17h30min, endereço eletrônico cep@forp.usp.br

Obrigado por ler e/ou ouvir estas informações. Se quiser consentir (concordar) que o(s) dente(s) extraído(s) possa(m) ser empregado(s) em pesquisa(s), assine este Termo de Consentimento e, no caso de menores, também o Termo de Assentimento e devolva-o(s) ao Biobanco de Dentes Humanos. Este Termo deverá ser assinado em **duas vias idênticas**, sendo uma retida pelo participante da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada no Biobanco.

Nome do consentidor ou responsável: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome da criança/adolescente: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome da pessoa que obteve o consentimento: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome do Supervisor do Biobanco: _____

Assinatura: _____

Anexo C – Termo de assentimento livre e esclarecido para coleta de dentes

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
BIOBANCO DE DENTES HUMANOS

TERMO DE ASSENTIMENTO

Você _____, natural de _____, nascido em ____/____/____, sexo _____ residente à _____, telefone (____) _____ portador(a) do RG _____, está sendo convidado(a) a consentir (concordar) que o(s) dente(s) extraído(s) _____, com grau de irrupção _____ por indicação terapêutica (tratamento) para a melhoria da sua saúde, como documentado em seu prontuário, possa(m) ser utilizado(s) pelos alunos desta Faculdade para treinamento(s) pré-clínico(s) e/ou pesquisa(s). O(s) dente(s) será(ão) armazenado(s) individualmente e identificado(s) por códigos, garantindo que você não seja identificado. Antes de decidir se quer consentir (permitir) que seu dente fique no Biobanco de Dentes da FORP-USP, é importante que você entenda porque utilizamos dentes humanos em pesquisas. A utilização do(s) dente(s) armazenado(s) será para aprimoramento de técnicas (tipos de tratamentos) e materiais empregados nas diversas áreas da Odontologia. Se você autorizar a coleta e armazenamento do(s) dente(s) extraído(s), para fins de pesquisa(s), seu(s) responsável(is) também terá(ão) que concordar. Mas se você não desejar autorizar, mesmo que seu(s) responsável(is) concorde(m), você poderá recusar esta(s) concessão(ões). Você pode discutir qualquer coisa deste formulário com seu(s) pai(s) e amigo(s). Você pode decidir se quer autorizar ou não depois de ter conversado e não é preciso decidir imediatamente. Pode haver algumas palavras que você não entenda ou coisas que você quer que eu explique mais detalhadamente, porque você ficou mais interessado ou preocupado. Por favor, peça que eu pare, a qualquer momento, e explique novamente. Não tenha pressa de decidir se deseja ou não concordar que o(s) dente(s) extraído(s) possa(m) ser utilizado(s) em pesquisa(s). Ninguém estará bravo com você se você disser não; a escolha é sua. Você pode pensar nisto e falar depois se você quiser. Você pode dizer “sim” agora e mudar de ideia depois e tudo continuará bem. Isso não vai prejudicar os cuidados que você recebe.

Este Termo foi revisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, que avalia projetos de pesquisa(s) e assegura que os mesmos não tragam nenhum dano ao(s) participante(s) da(s) pesquisa(s). Este Comitê de Ética está localizado à Avenida do Café s/n, bairro Monte Alegre, CEP 14040-904, Ribeirão Preto-SP, telefone (16) 33150251, com horário de atendimento de segunda à sexta-feira, das 8h às 12h, endereço eletrônico cep@forp.usp.br, sendo sua secretária a Sra. Marcela de Souza Scatolin. Se você precisar de mais informações sobre este Termo, sobre os seus direitos ligue para o Biobanco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, localizado à Avenida do Café s/n, bairro Monte Alegre, CEP 14040-904, Ribeirão Preto-SP, telefone (16) 33150274, atendimento de segunda à sexta-feira, das 8h às 12h e das 13h às 17h. A utilização deste(s) dente(s) em pesquisa(s) deverá ser previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa, sendo preservada sua identidade na divulgação. Solicito que manifeste o seu desejo quanto às seguintes alternativas:

() I- Necessidade de novo consentimento a cada pesquisa

() II- Dispensa de novo consentimento a cada pesquisa

Nenhum incentivo ou recompensa financeira está previsto por você concordar com a coleta do(s) dente(s) extraído(s). Obrigado por ler e/ou ouvir estas informações. Se quiser consentir (concordar) que o(s) dente(s) extraído(s) possa(m) ser empregado(s) em pesquisa(s), assine este Termo e devolva-o ao Biobanco de Dentes Humanos. Este Termo deverá ser assinado em **duas vias idênticas**, sendo uma para os pais ou responsáveis e a outra arquivada no Biobanco.

Nome dos pais/responsáveis legais: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome da criança/adolescente: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome da pessoa que obteve o consentimento: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome do Supervisor do Biobanco: _____

Assinatura: _____ Data: _____