

Carolina Chiantelli Cláudio Coutinho

*Expressão das proteínas
Osteoprotegerina, RANK e
RANKL*

*durante o processo de reparo alveolar em
ratos. Estudo imunohistoquímico.*

Araçatuba
2005

Carolina Chiantelli Cláudio Coutinho

*Expressão das proteínas
Osteoprotegerina, RANK e
RANKL durante o processo de
reparo alveolar em ratos. Estudo
imunohistoquímico.*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Unesp, para a obtenção do Grau de “Mestre em Odontologia” – Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Profa. Dra. Roberta Okamoto
Co-orientador: Prof. Dr. Roelf Justino Cruz Rizollo

ARAÇATUBA – SP
- 2005 -

Dados Curriculares

- NASCIMENTO** : 14.08.1979 – Araçatuba/SP.
- FILIAÇÃO** : Sadraque Cláudio
Maria Angela Chiantelli Cláudio
- 1997/2001** : Curso de Graduação na Universidade
Paulista Campus de Araçatuba - UNIP
- 1999/2001** : Estagiária do Departamento de Cirurgia e
Clínica Integrada, Disciplina de Cirurgia e
Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, na
Faculdade de Odontologia de Araçatuba –
UNESP.
- 2003**..... : Aluna Especial de Mestrado na Faculdade
de Odontologia de Araçatuba – UNESP;
Estagiária do Departamento de Cirurgia e
Clínica Integrada, disciplina de Cirurgia e
Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, na
Faculdade de Odontologia de Araçatuba –
UNESP.
- 2004/2005** : Curso de Pós-Graduação em Odontologia,
Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-
Maxilo-Facial, nível de Mestrado, na
Faculdade de Odontologia de Araçatuba –
UNESP.

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro que viabilizou a realização deste trabalho de pesquisa.

Processo 04/01959-0

Dedicatória

Ao meu marido Marcio, pela imensa confiança, compreensão e amor. Nada seria possível sem o seu incentivo. Compartilhar a vida com você é indescritível. Com todo o meu amor.

Aos meus pais, Sadraque e Angela, pelos valores e ensinamentos ao longo da vida. Agradeço pelo amor, paciência e confiança. Amo vocês.

À minha irmã, Cristiane, pela torcida, incentivo e sugestões. Você me faz crescer muito. Obrigado.

Aos meus avós, sabendo que perto ou longe, vocês sempre estão junto de mim.

Agradecimentos Especiais

À Minha Orientadora Prof. Dra. Roberta Okamoto, pelo convívio fabuloso, aprendizado incansável e liberdade de trabalho. Agradeço todo o empenho e carinho dedicados a mim, durante esta jornada. Meu eterno agradecimento e admiração.

Ao grande mestre e amigo Prof. Dr. Tetuo Okamoto, responsável pelos meus primeiros passos na vida acadêmica e científica. Agradeço toda confiança e dedicação ao longo dos anos. Sempre será lembrado e agradecido.

Ao Prof. Dr. Roelf Justino Cruz Rizzolo por me proporcionar novas experiências acadêmicas e científicas, confiando sempre em meu trabalho. Meu sincero agradecimento pelo tempo de convivência que gerou importantes resultados.

Aos Profs. Cláudio Aparecido Casatti e Edilson Ervolino pela incansável disposição e dedicação.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin e de seu vice-diretor Prof. Dr. Célio Percinoto, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, na pessoa do coordenador do curso Prof. Dr. Wilson Roberto Poi, pelo alto nível científico oferecido a este programa.

Ao Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior e Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho pela amizade, convivência, paciência e oportunidade de aprendizado. Meu crescimento pessoal e profissional foi ainda maior convivendo com vocês.

À Profa. Dra. Alessandra Marcondes Aranega pela amizade e por acreditar em minha capacidade. Sem o seu incentivo e orientação, tudo seria mais difícil. Meu sincero agradecimento.

Aos professores Dr. Michel Saad Neto e Dra. Cristiane Mara Ruiz de Sousa Fattah pela amizade e ensinamentos clínicos e científicos.

Aos meus colegas de Pós-graduação, cada qual com características e qualidades inconfundíveis, por tornarem os momentos muito mais agradáveis: Camila Benez Ricieri, Cristiano Gaujac, Eduardo Facó, Francisley Ávila, Jéssica Gulinelli, Leandro Carvalho Cardoso, Marcelo Kayatt Lacoski, Thais da Silveira Rodrigues e Thallita Queiróz.

Aos colegas Albanir Borrasca, Cláudia Leal, Eloá

Luzizuto, Flávia Pereira e Sheila Dias pela colaboração, carinhoso convívio e torcida durante toda esta jornada.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela constante torcida e carinho: Ana Cláudia Macedo Matara, Bernadete Maria Nunes Kimura, Cleide Lemes da Silva, Gilmar Martins de Oliveira, Glauco José de Carvalho e Maria Dirce Colli Boatto.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Básicas – UNESP, pela disposição e incentivo: André Luis de Matos Piedade, Hilda Teixeira e Sandra Blandy.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Unesp, pela disposição com que sempre nos atenderam.

As funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Unesp: Marina e Valéria, pela espontaneidade e alegria com que sempre nos receberam.

Ao Prof. Victor Elias Arana Chavez pela disposição com que sempre nos atendeu.

À profissional e amiga, Maria Cristina Martins Villela pelas oportunidades e pelo incentivo na vida clínica.

Ao meu sogro, Paulo Coutinho da Silveira, pelo convívio e carinho com que sempre me atendeu.

Aos amigos Marco, Alessandra e Júlio por compreenderem os momentos de minha ausência. A torcida de vocês é entusiasmante.

Epígrafe

“Há homens que lutam um dia e são bons.

Há outros que lutam um ano e são melhores

Há os que lutam muitos anos e são muito bons.

Porém, há os que lutam toda a vida.

Esses são os imprescindíveis.”

Bertold Brecht

Sumária

Lista de Abreviaturas.	15
Resumo.	16
Abstract.	18
1- Introdução.	20
2- Expressão das proteínas osteoprotegerina, RANK e RANKL durante o processo de reparo alveolar em ratos. Estudo imunoistoquímico.	24
• Introdução.	24
• Proposição.	25
• Material e método.	26
• Resultado.	28
• Discussão.	36
• Conclusão.	40
• Referências bibliográficas.	41
3- Anexos	44
• Anexo A – Material e método: Protocolo de perfusão transcardíaca em ratos e padronização de técnica imunoistoquímica em tecido ósseo.	45
• Anexo B - Receitas utilizadas em laboratório.	59
• Anexo C – Ilustração da técnica de extração dental em ratos	62
• Anexo D - Aprovação do comitê de ética.	63

Lista de Abreviaturas

Osteoprotegerina	OPG
Receptor Activator Nuclear Kappa-B	RANK
Receptor Activator Nuclear Kappa-B Ligand	RANKL
Tampão Fosfato de Sódio	PBS
Micrometros	μm
Paraformaldeído	PFA
Microlitros	μl

Resumo

CLÁUDIO-COUTINHO, CC. Expressão das proteínas osteoprotegerina, RANK e RANKL durante o processo de reparo alveolar em ratos. Estudo imunohistoquímico, [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2005.

Na dinâmica da reparação óssea os fenômenos de reabsorção e neoformação são dependentes e acoplados. Proteínas efetivamente envolvidas na diferenciação celular determinam ativação ou inibição das atividades que regulam o ganho ou perda de massa óssea. Dentre as proteínas ósseas identificadas e envolvidas na dinâmica óssea podemos destacar a OPG, a RANK e RANKL como marcadores de atividades celulares. O presente trabalho tem como objetivo identificar, nos diferentes períodos da cronologia do processo de reparo alveolar através de técnica imunohistoquímica, a presença das proteínas OPG, RANK e RANKL. Para tanto foram utilizados 60 ratos machos submetidos à exodontia do incisivo superior direito e perfundidos aos 14, 21 e 28 dias pós-operatórios. As hemi-maxilas contendo o alvéolo dental em reparação foram removidas, pós-fixadas, descalcificadas em EDTA, crioprotetidas e obtidos cortes longitudinais com 14 μ m em criostato. Os cortes foram submetidos à reação imunohistoquímica mediante a utilização de anticorpos primários para OPG, RANK e RANKL, como amplificador foi utilizado o sistema avidina-biotina e a diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. Os resultados mostram que qualitativamente ocorre um balanço na expressão das proteínas que caracterizam reabsorção e neoformação óssea nos diferentes períodos estudados, onde aos 14 e 21 dias ocorre maior expressão de RANK. Com relação às proteínas OPG e RANKL, observa-se que elas apresentam-se expressas nas células da linhagem osteoblástica de forma similar, sendo que 28 dias é o período de maior expressão destas proteínas.

Palavras-chave: osteoprotegerina, RANK, RANKL, cicatrização de feridas.

Abstract

CLÁUDIO-COUTINHO, CC. Expression of OPG, RANK and RANKL proteins during the alveolar bone healing in rats. A immunohistochemistry study. [dissertação] Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2005.

In the bone healing dynamics, the resorption and neoformation processes are dependent. Proteins involved in the cellular differentiation determinate the activation or inhibition of the activities that regulate the gain or loss of bone mass. From all of the identified bone proteins, it may be distinguished the OPG, RANK and RANKL. The present study has the aim to identify, in the different periods of alveolar bone healing chronology, the expression of OPG, RANK and RANKL proteins using the immunohistochemistry methodology. To perform this study, 60 male rats had the right upper incisive extracted and they were perfused at 14, 21 and 28 pos-operative days. The hemimaxilla with the rat extraction socket was removed, pos fixed and decalcified in EDTA. Then, they were cryoprotected and longitudinal slices with 14 μm thickness were obtained in cryostat. The slices were submitted to immunohistochemistry reaction and the primary antibodies used were against OPG, RANK and RANKL proteins. It was used the avidin-biotin system to amplify the sign and diaminobenzidine was the cromogen. The results show that there is a balance in the expression of the proteins, showing that there is an increase in the expression of RANK at 14 and 21 pos-operative periods. In relation to OPG and RANKL, these proteins presents a similar expression in all of the pos-extraction periods analysed in this study and at 28 days after the extraction there is the greater expression of both proteins.

Key-words: osteoprotegerin, RANK, RANKL, wound healing.

1 Introdução

O estudo do processo de reparo em feridas de extração dental foi iniciado por Euler¹ ao relatar alterações que ocorrem durante este processo em alvéolo de cães. Sucessivos trabalhos deram continuidade às pesquisas sobre o processo de reparo alveolar²⁻¹¹, definindo cronologicamente as reações teciduais desencadeadas no interior do alvéolo.

De acordo com Simpson¹², após a extração dental, a reparação normal do alvéolo prossegue passando basicamente por quatro estágios:

- 1- Preenchimento total do alvéolo por coágulo sangüíneo;
- 2- Proliferação celular (fibroblastos, células endoteliais e inflamatórias) para o interior do coágulo sangüíneo formando tecido de granulação;
- 3- Gradual reposição do tecido de granulação por trabéculas ósseas e,
- 4- Maturação e remodelação do osso neoformado no interior do alvéolo.

No entanto, a reparação alveolar é considerada completa, quando o alvéolo se encontra totalmente preenchido por tecido ósseo neoformado e a crista alveolar remodelada. Esta reparação ocorreria normalmente no rato em torno de 28 dias pós-exodônticos¹³, no cão aos 56 dias¹⁴ e aos 64 dias no homem^{15,16}. Diferentes métodos têm contribuído para o estudo do processo de reparo alveolar, como a fluorescência microscópica⁴, marcação radioativa, auto-radiografias^{6,7} e histoquímica¹⁰.

Estudos direcionados à identificação de fatores de crescimento e de proteínas efetivamente envolvidas no processo de reparação óssea e na regulação da atividade osteoblástica/osteoclástica estão sendo possibilitados com o surgimento de técnicas como a imunohistoquímica, hibridização *in situ*, PCR, etc.

Sabe-se hoje que proteínas, hormônios, fatores de crescimento, citocinas, peptídeos e outros reguladores atuam diretamente em células que desencadeiam os processos de neoformação, reabsorção e mineralização óssea. Estes mesmos reguladores fazem manutenção do tecido ósseo, participando do constante processo de remodelação no osso e portanto da manutenção da homeostasia mineral.

Dentre as proteínas ósseas envolvidas na dinâmica óssea podemos destacar a Osteoprotegerina (OPG), a RANKL e RANK como marcadores

de atividades celulares.

A expressão destas proteínas vem sendo analisada em biópsias de tecido ósseo de pacientes portadores de enfermidades como mieloma múltiplo¹⁷, artrite reumatóide¹⁸, desordens osteoclásticas¹⁹ e principalmente no diagnóstico de osteoporose²⁰.

Estas proteínas têm sido estudadas principalmente com a finalidade de se analisar a dinâmica da neoformação/reabsorção que ocorre dentro da homeostasia óssea. Estudos mostram que camundongos com deficiência na expressão da OPG apresentam osteoporose²¹. A expressão das proteínas OPG, RANK e RANKL também tem sido detectadas em células do ligamento periodontal, sugerindo suas participações como moduladores dos processos de reabsorção que ocorrem no periodonto de inserção²².

Visto as peculiaridades e particularidades ocorridas durante o processo de reparo alveolar, em função das condições em que esse processo ocorre, frente à necessidade de um melhor entendimento da biologia óssea e dos eventos que determinam atividades celulares que geram os processos de reabsorção e neoformação óssea, a evidenciação da expressão das proteínas osteoprotegerina, RANK e RANKL trará novas informações a respeito da dinâmica do tecido ósseo e da manutenção da homeostasia mineral durante o processo de reparo alveolar.

2- Expressão das proteínas Osteoprotegerina, RANK e RANKL durante o processo de reparo alveolar em ratos. Estudo imunoistoquímico.

1- Introdução

O osso é um tecido dinâmico que sofre constante remodelação. Esse processo fisiológico acontece às custas de um balanço exercido entre células com atividade osteoblástica e osteoclástica¹. Proteínas, hormônios, fatores de crescimento e citocinas, estão ativamente envolvidos nesse processo e exercem atividade direta sobre estes tipos celulares, atuando em sua diferenciação e ativação metabólica².

A reparação alveolar é um processo gerado a partir de células presentes nos remanescentes de ligamento periodontal, aderido às paredes alveolares após a extração dental³. O alvéolo dental em reparação apresenta alta atividade celular, na tentativa de que a homeostasia local seja restituída tão logo quanto possível³⁻⁴.

A presença das proteínas ósseas Osteoprotegerina, RANK e RANKL está efetivamente envolvida na diferenciação celular e ativação de

processos metabólicos, que regulam as atividades celulares responsáveis pelo ganho ou perda de massa óssea^{2,5-6}.

Na membrana de células da linhagem de osteoclastos e em células dendríticas está presente a RANK⁷, uma proteína receptora responsável pelo controle da osteoclastogênese⁸ e metabolismo do cálcio. O ligante da RANK (RANKL) é uma proteína produzida pelos osteoblastos, células do estroma ósseo e pelos linfócitos T ativados, e pode promover a reabsorção óssea ao ligar-se a superfície de pré-osteoclastos, estimulando sua diferenciação e ativação em osteoclastos. A osteoprotegerina^{7,9}, uma proteína também produzida por osteoblastos e células do estroma ósseo, é capaz de se ligar a RANKL impedindo sua ligação a RANK. Essa proteína, ao se ligar a RANKL inibe a maturação dos osteoclastos, contendo assim a osteoclastogênese⁹.

Visto que o metabolismo ósseo, em condições fisiológicas, apresenta um equilíbrio entre a capacidade de induzir neoformação e reabsorção óssea, sem que o processo de reparação óssea seja prejudicado é de interesse científico um melhor entendimento da expressão destas proteínas durante a cicatrização de feridas de extração dental.

2- Proposição

É objetivo deste estudo, avaliar a expressão das proteínas

Osteoprotegerina, RANK e RANKL durante o processo de reparo alveolar após a extração de incisivo superior de ratos, utilizando como ferramenta metodológica a técnica imunoistoquímica.

3- Material e método

Para a realização do presente estudo foram utilizados 60 ratos (*rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, adultos, com peso variando entre 220-250 gramas. Estes animais, antes e durante o período experimental, adequaram-se às normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (FOA-UNESP - protocolo nº38/04).

Após indução da anestesia geral por infiltração intramuscular de Coopazine (Xilazina – Coopers Brasil Ltda) e Vetaset (Cloridrato de quetamina injetável - Fort Dodge Saúde Animal Ltda) na dosagem indicada conforme fabricante e anti-sepsia do campo operatório com polivinilpirrolidona iodada (Riodeine – Indústria Química e Farmacêutica Rioquímica Ltda), foi realizada a extração do incisivo superior direito de todos os animais, com instrumental especialmente adaptado para este fim. Os alvéolos foram suturados com fio de poliglactina 910 (Vicryl 4-0)¹⁰.

Seguidos os períodos experimentais de 14, 21 e 28 dias pós-operatórios, os animais foram perfundidos, inicialmente com solução salina tamponada e posteriormente com formaldeído 4% (Acros Organics),

utilizando bomba perfusora Masterflex® LS (Cole-Parmer Instrument Company). Ao término da perfusão, a maxila direita foi separada da esquerda realizando uma incisão ao nível do plano sagital mediano, acompanhando a sutura intermaxilar. Um outro corte, com tesoura reta, tangenciando a face distal do último molar possibilitou a obtenção da peça. Os espécimes assim obtidos foram mantidos em solução fixadora (formaldeído 4%) por 6 horas à temperatura de 4°C, lavadas em solução tampão (PBS) e imersas em solução descalcificadora. O descalcificador de escolha foi o EDTA, na concentração de 5%, pH 7,0, dissolvido em água MiliQ, por um período de 42 dias. Uma vez descalcificadas, as peças foram novamente lavadas, por 24 horas, e então crioprotetidas utilizando sacarose 30% (Merck). As peças foram fixadas em um suporte metálico utilizando Tissue Tek® O.C.T. Compound (Sakura), possibilitando a obtenção de cortes longitudinais com 14 µm de espessura em criostato, montados em lâminas previamente gelatinizadas.

Foi realizada a inibição da peroxidase endógena com água oxigenada 30% e o bloqueio das reações inespecíficas foi feito com soro normal de burro 5%.

Como anticorpos primários foram utilizados a Osteoprotegerina - OPG (Rabbit anti-opg - Santa Cruz Biotechnology – SC11383), a RANKL (Goat anti-rankl - Santa Cruz Biotechnology – SC7627) e a RANK (Rabbit anti-rank - Santa Cruz Biotechnology – SC9072). Os anticorpos

secundários foram anti-coelho biotinilado produzido em burro (Biotin-SP-AffiniPure donkey anti-rabbit IgG - Jackson Immunoresearch Laboratories – 711.065.152) e anti-cabra biotinilado produzido em burro (Biotin-SP-AffiniPure donkey anti-goat IgG - Jackson Immunoresearch Laboratories – 705.065.147).

O sinal da reação imunoistoquímica foi amplificado com o sistema avidina-biotina (Kit ABC- Vectastain Elite ABC – Peroxidase Standard, reagent A and B only – PK6100 – Vector Laboratories) e a reação foi revelada utilizando a diaminobenzidina (DAB- Sigma) como cromógeno. Foram realizados controles imunoistoquímicos, para avaliação da efetividade e especificidade das reações. A coloração em hematoxilina e eosina também foi realizada como uma referência para a citoarquitetura dos cortes analisados. As análises foram realizadas qualitativamente em microscópico de luz.

4- Resultado

Foram realizadas reações imunoistoquímicas utilizando anticorpos contra as proteínas Osteoprotegerina, RANK e RANKL, analisadas durante o processo de reparo alveolar aos 14, 21 e 28 dias após exodontia. As análises foram realizadas no terço médio do alvéolo, por ser a região onde o processo de reparo ocorre de maneira mais uniforme³.

Ao analisarmos as marcações contra a proteína RANK (figs. 1-6), os resultados mostram a imunomarcação de células com morfologia semelhante a osteoblastos, que se encontram localizadas na interface do tecido ósseo, próximo ao osteóide (fig. 4). Através de análise qualitativa, podemos sugerir que ocorre maior imunomarcação do anticorpo contra RANK, nos períodos de 14 e 21 dias pós-exodônticos.

Observamos também, a imunomarcação para o anticorpo contra RANK nas células de revestimento do tecido ósseo (fig. 2). Estas células marcadas positivamente, apresentam morfologia semelhante a osteoblastos, que pela ausência de atividade metabólica, adquirem forma alongada e desempenham papel de revestimento do tecido ósseo.

Nas reações imunoistoquímicas realizadas para a identificação da proteína Osteoprotegerina (figs. 7-12), notamos marcações específicas para osteoblastos, localizados na periferia das trabéculas ósseas neoformadas e também em células de revestimento (fig. 10). Os osteócitos, localizados no interior do trabeculado ósseo, também foram evidenciados (fig. 12). As imunomarcações foram analisadas em todos os períodos estudados e através de análise qualitativa, sugere-se maior expressão dessa proteína aos 28 dias pós-operatórios.

Nas reações realizadas para a evidenciação da proteína RANKL (figs. 13-18), observamos marcações específicas de células com citoarquitetura semelhante à linhagem de osteoblastos. Tanto osteoblastos

(fig. 14), quanto células de revestimento (fig. 16) e osteócitos (fig. 18) são marcados positivamente nas reações realizadas. Através de análise qualitativa é possível observar que ocorre um aumento na expressão da RANKL nas células da linhagem osteoblástica, no decorrer do processo de reparo alveolar, sendo que o período de maior expressão desta proteína é aos 28 dias pós exodontia.

Reações de controle no processamento imunohistoquímico são realizadas com rotina, comprovando a ausência de marcações inespecíficas.

Nos controles negativos observamos um corte isento de marcações, o que comprova a especificidade das reações (fig. 19). Nos controles positivos, realizados em cortes transversais, avaliou-se a cavidade nasal, onde foram identificadas imunomarcações em células com morfologia semelhante a macrófagos (fig. 20).

Foram realizados controles histológicos, corados pela hematoxilina e eosina – HE, para comparação da citoarquitetura das células ósseas e avaliação das condições fisiológicas da reparação (figs. 21-24).

Em função das marcações da proteína RANK, em células semelhantes a osteoblastos, foi realizada uma contra-coloração com Hematoxilina e Eosina após reação imunohistoquímica (figs. 21-22). Desta forma, a contra-coloração realizada serviu para observarmos que essas células marcadas positivamente contra a proteína RANK, apresentam localização e morfologia compatível a linhagem de células osteoblásticas

(figs. 21 e 22). Foram realizados também, reações imunoistoquímica em cabeças de fetos de ratos com aproximadamente 21 dias de gestação, onde estes, apresentam apenas osteoblastos e osso primário (figs. 23 e 24).

Prancha ilustrativa histológico – Expressão da proteína RANK.

Prancha ilustrativa histológico – Expressão da proteína Osteoprotegerina.

Prancha ilustrativa histológico – Expressão da proteína RANKL.

Prancha ilustrativa - Controles positivo e negativo

5- Discussão

Nossos resultados revelam a expressão de Osteoprotegerina, RANK e RANKL em células da linhagem osteoblástica nos períodos de 14, 21 e 28 dias pós-exodônticos, durante o processo de reparo alveolar em ratos.

Muitos estudos avaliam a expressão das proteínas OPG, RANK e RANKL, principalmente nos casos de desordens ósseas, como o mieloma múltiplo, artrite reumatóide, desordens osteoclásticas e osteoporose¹¹⁻¹⁴.

Os estudos que descrevem a expressão da proteína RANK citam marcações específicas dessa proteína em pré-osteoclastos e fibroblastos¹⁵.

Em nossos experimentos, observamos que há marcações em células com morfologia semelhante a osteoblastos, localizadas na periferia do osteóide.

Dois aspectos precisam ser considerados diante dessas evidências. O primeiro deles, é a marcação bastante expressiva destas células, semelhantes a osteoblastos, o que é reforçado nos cortes corados pela HE, onde ao observarmos a citoarquitetura do tecido, podemos caracterizar a semelhança quanto à morfologia celular, das células analisadas. Com o intuito de se confirmar a imunomarcção da proteína RANK em osteoblastos, foram realizados os experimentos em que se associou a reação imunoistoquímica para RANK e a coloração por hematoxilina e eosina. Estes experimentos mostraram que os osteoblastos localizados ao redor das trabéculas ósseas neoformadas, apresentavam-se imunoreativos para a RANK. Ainda com o objetivo de confirmar a imunomarcção da proteína RANK em osteoblastos, foram realizados experimentos em fetos de ratos com aproximadamente 21 dias de gestação, nos quais encontram-se presentes apenas osteoblastos e osso primário. Os experimentos realizados mostraram imunomarcção positiva da RANK nos osteoblastos do osso primário dos fetos.

Os experimentos de controle positivo, em que pudemos observar imunomarcção para os macrófagos da cavidade nasal, mostram que o anticorpo que utilizamos apresenta especificidade para a imunomarcção das células da linhagem de macrófagos. Além disso, há evidências de que a

proteína RANK, também se expresse em fibroblastos. Experimentos realizados em nosso laboratório mostram que o anticorpo utilizado contra RANK promoveu imunomarcção de células semelhantes a fibroblastos do ligamento periodontal. Portanto, a hipótese da não especificidade do anticorpo foi levantada, mas rapidamente descartada, uma vez que as reações realizadas mostram que o anticorpo utilizado promove marcações de acordo com informações descritas na literatura¹⁶⁻¹⁸. Um outro aspecto a ser considerado, é a alteração do metabolismo celular, que pode ocorrer durante o processo de reparo alveolar. Devemos considerar que o osso, em condições fisiológicas, apresenta uma dinâmica resultante do equilíbrio entre a atividade osteoblástica e osteoclástica. Assim, de acordo com a literatura, OPG, RANK e RANKL, encontram-se em equilíbrio dinâmico¹⁻², quando o tecido ósseo encontra-se em estado fisiológico.

A manobra de exodontia interfere na dinâmica do tecido ósseo e a partir daí, o organismo cria condições para que um novo osso seja formado, promovendo reparação alveolar. Uma hipótese que podemos considerar é que nos osteoblastos, a proteína RANK faz parte da sua membrana, apresentando-se localizada numa região mais interna. Em função do aumento do metabolismo celular, pelo processo de reparo alveolar, os osteoblastos podem sofrer uma alteração de conformação deste receptor na membrana, tornando-o mais exposto, de forma que possa ser marcado pelo anticorpo contra RANK durante a reação imunoistoquímica.

Esta hipótese é reforçada, por estudos mostrando que tanto OPG, quanto RANKL são produzidas por osteoblastos^{11-14,17-19}. Portanto, os osteoblastos, poderiam apresentar o próprio receptor para a proteína que sintetizam, caracterizando uma sinalização celular autócrina²⁰. Além disso, mesmo que qualitativamente, podemos observar intensa imunomarcção da proteína RANK aos 14 e 21 dias pós-operatórios, períodos em que se sugere uma maior atividade metabólica do tecido ósseo, bem como maior produção de osso, o que reforçaria esta hipótese.

Quanto aos resultados com o anticorpo contra a OPG, podemos observar imunomarcção principalmente em osteócitos e células de revestimento, com maior tendência de expressão aos 28 dias. Estes resultados estão de acordo com a literatura, que mostra a imunomarcção da OPG em células da linhagem osteoblástica¹⁷⁻¹⁸. A imunomarcção para OPG também pode ser considerada uma evidência da predominância de formação óssea ocorrendo durante o processo de reparo alveolar. Vale destacar que nossos experimentos estudam a expressão destas proteínas em condição especial, durante o processo de reparo alveolar pós exodontia e que até então, não havia sido estudada. Com relação à RANKL, nossos resultados mostram que há um aumento na expressão desta proteína nos osteoblastos e o período de maior expressão ocorre aos 28 dias como a OPG. Este aspecto é bastante importante e evidencia o equilíbrio entre os processos de neoformação, representado pela OPG e de reabsorção óssea,

representado pela RANKL, em todos os períodos da cronologia do processo de reparo alveolar analisados. Portanto, a análise conjunta da expressão das 3 proteínas mostra que a RANK tem o predomínio da sua expressão aos 14 e 21 dias pós exodontia, marcando principalmente os osteoblastos do osso primário e a OPG e RANKL, apresentam-se com marcações de intensidade similar e com a maior marcação ocorrendo no período de 28 dias, período em que o alvéolo do rato já se encontra praticamente todo reparado.

As reações realizadas mostram marcações específicas do anticorpo primário, já que o controle negativo apresenta-se isento de marcação. Os experimentos controle positivo foram realizados apenas para o anticorpo contra a RANK, em função dos resultados e pudemos observar que o anticorpo utilizado promove imunomarcação de acordo com as informações descritas na literatura¹⁶.

Considerando todos esses aspectos, os nossos experimentos permitem-nos sugerir até então, a imunomarcação de RANK em células semelhantes a osteoblastos, próximos a periferia do osteóide, nos 3 períodos analisados. Por outro lado, a OPG se expressa principalmente em osteócitos e células de revestimento, também em todos os períodos analisados. A RANKL apresenta-se constante em suas marcações, evidenciadas durante a cronologia de reparo alveolar.

6- Conclusão

Diante da metodologia empregada e dos resultados obtidos foi possível concluir que ocorre a expressão das proteínas Osteoprotegerina, RANK e RANKL durante o processo de reparo alveolar, em todos os períodos analisados.

Após análise qualitativa, podemos notar que ocorre um balanço na presença destas proteínas, sendo a maior expressão da Osteoprotegerina aos 28 dias pós-operatórios e da RANK aos 14 e 21 dias pós-operatórios. A RANKL, semelhante a OPG, apresenta-se com uma maior expressão aos 28 dias pós-operatórios.

7- Referências bibliográficas

- 1 Teitelbaum ST. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289: 1504-1508.
- 2 Ducey P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000; 289:1501-1504.
- 3 Carvalho ACP, Okamoto T. Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados a clínica. São Paulo: Panamericana, 1987.

- 4 Okamoto T, Russo MC. Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats. *Rev. Fac Odontol Araçatuba* 1973; 2 (2):153-69.
- 5 Takahashi N, Udagawa N, Suda T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Bioch Biophys Reserch Com* 1999; 256:449-455.
- 6 Aubin JE, Bonnelye E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int* 2000; 11:905-913.
- 7 Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endroc Rev* 1999; 3,345-57.
- 8 Kaneda T, Nojima T, Nakagawa M. Endogenous production of TGF-beta is essential for osteoclastogenesis induced by a combination of receptor activator of NF-Kappa B ligand and macrophage-colony-stimulating factor. *J Immunol* 2000; 165, 4254-4263.
- 9 Shalhoub V, Faust J, Boyle WJ, et al. Osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand effects on osteoclasts formation from humam peripheral blood mononuclear cell precursors. *J Cell Biochem* 1999; 72, 251-261.
- 10 Passeri LA. Observações clínicas sobre o emprego de poliglactina 910 (polyvicryl) em suturas intrabucais. *Rev Regional Araçatuba APCD* 1982; 3(1):5-7.
- 11 Roux S, Meignin V, Quillard J, Meduri G, Guiochon-Mantel A, Fernand JP, Milgrom E, Xavier M. Rank (receptor activator of nuclear

- factor – [kappa]B) and Rankl expression in multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 2002; 117(1): 86-92.
- 12 Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor –Kappa B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001; 79:243-253.
 - 13 Helfrich MH. Osteoclast diseases. *Microsc Res Tech* 2003; 61(6):514-32.
 - 14 Hofbauer LC, Shoppet M. Osteoprotegerin: a link between osteoporosis and arterial calcification? *Lancet* 2001; 358(9278):257-9.
 - 15 Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001; 142(12):5050-5055.
 - 16 Muller RJ, Richards RG. Immunohistological identification of receptor activator of NF-KB ligand (RANKL) in human, ovine and bovine tissues. *Journal of material science: materials in medicine* 2004; 15:367-372.
 - 17 Stejskal D, Zurek M, Bartek J, Jeldelsky L, Růžčka V. Osteoprotegerin and bone density. *Biomed. Papers* 2001; 145(2):75-76.
 - 18 Stejskal D, Bartek J, Pastorková R, Růžčka V, Oral I, Horalík D. Osteoprotegerin, RANK, RANKL. *Biomed. Papers* 2001; 145(2), 61-64.
 - 19 Hasegawa T, Yoshimura Y, Kikuri T, Yawaka Y, Takeyama S, Matsumoto A, Oguchi H, Shirakawa T. Expression of receptor activator of N. F. [kappa] B ligand and osteoprotegerin in culture of human periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research* 2002; 37(6): 405-411.
 - 20 Cotran RS. *Robbins pathologic basis of disease*. Philadelphia: Saunders, 1994.

Anexas

Anexo A – Material e Método

Protocolo de perfusão transcardíaca em ratos e padronização de técnica imunoistoquímica em tecido ósseo.

1- Introdução

A técnica imunoistoquímica é uma ferramenta metodológica utilizada para a identificação de proteínas, citocinas, peptídios, hormônios, fatores de crescimento, entre outros reguladores de atividades celulares efetivamente envolvidos no metabolismo humano. Atua evidenciando estes reguladores, em condições de alta atividade metabólica ou em processos homeostáticos.

Para a utilização desta ferramenta metodológica, as peças a serem analisadas sofrem tratamento diferenciado com a finalidade de preservar as estruturas celulares o mais próximo de como são em vida.

Cuidados inerentes ao manuseio e sacrifício dos animais, processo de descalcificação, lavagem de peças, incubação de anticorpos, assim como a marca, concentrações e meios de diluição das soluções utilizadas para tais procedimentos, visam à preservação tecidual das estruturas a serem estudadas pela delicada atuação dos reguladores nos tecidos.

As reações realizadas através desta metodologia seguem critérios específicos que devem ser respeitados minuciosamente.

Este anexo tem por objetivo relatar detalhadamente a metodologia empregada para a realização de técnica imunoistoquímica em tecido ósseo.

2- Descrição da técnica de perfusão transcardíaca em ratos

A manobra de perfusão transcardíaca é o método que simula o funcionamento do sistema circulatório, uma vez que se injetam no interior dos vasos, soluções fixadoras que perfundem os tecidos e os fixam o mais próximo da atividade metabólica em vida. Pode ser realizada em qualquer animal, sofrendo variação de protocolos conforme a espécie e está indicada para a fixação de peças que serão submetidas à microtomia, para a realização de reação imunoistoquímica.

O processo consiste inicialmente na retirada da volemia sangüínea através da lavagem feita com solução salina, para posteriormente processar-se então a fixação através da injeção de solução fixadora. As soluções são impulsionadas no interior dos vasos, através de cânulas acopladas a mangueiras ligadas a uma bomba peristáltica, de modo que a pressão da injeção da solução fixadora não ultrapasse a pressão sangüínea.

Para a realização da perfusão transcardíaca é essencial à ausência de sangue coagulado nos vasos e para evitar esse imprevisto é conveniente

administrar solução anticoagulante direto no coração do animal, antes do início da manobra de perfusão.

A lavagem realizada para a retirada da volemia sangüínea é feita com solução salina, pH neutro, no volume de aproximadamente 50ml para cada animal, e deve ser ministrada a temperatura ambiente. A solução fixadora de escolha em nosso protocolo é o formaldeído (Acros Organics) 4%, pH 9.5, com o volume de 700ml para cada animal; o fixador deve ser preparado na véspera da realização do procedimento e no momento da perfusão deverá estar resfriado.

A filtração criteriosa das soluções utilizadas é um cuidado a ser considerado, visto que grânulos do soluto podem promover a obstrução de pequenos vasos e o conseqüente impedimento do fluxo das soluções através dos tecidos, comprometendo o resultado final do procedimento.

O procedimento deve ser realizado em capela, com equipamentos de proteção individual como jaleco, luva, óculos, gorro e máscara especial em função do poder carcinogênico da solução fixadora.

Após a anestesia profunda do animal (figs. 1 e 2), o mesmo deverá ser imobilizado em um suporte de madeira em decúbito dorsal horizontal, mantendo a cabeça, as patas traseiras e dianteiras fixas (fig. 3). Expõe-se parte da cavidade abdominal (figs. 5-7), e torácica, após rompimento do diafragma e rebatimento das costelas, com o intuito de evidenciarmos o coração (fig. 8). Uma vez que o coração encontra-se evidente, ministra-se

solução anticoagulante (heparina sódica - 0,01ml/animal – fig. 9) utilizando-se seringa mensurada e agulha delicada direta no coração (fig. 10); é realizado um pequeno corte com tesoura de ponta fina no ventrículo esquerdo do animal (fig. 11) e outro no átrio direito (fig. 12), visando impedir o retorno venoso. A cânula ligada à bomba perfusora é introduzida no corte realizado no ventrículo esquerdo, transfixando o coração e permanecendo imóvel, de modo que sua ponta fique posicionada dentro da artéria aorta (figs. 13 e 14). A bomba perfusora peristáltica utilizada é a Masterflex® LS (Cole-Parmer Instrument Company – fig. 4), inicialmente regulada com velocidade de 45 ml/min.

A solução salina é injetada nos tecidos até lavagem sangüínea completa do animal, indicada pela coloração amarelada do fígado. A solução fixadora é então ministrada, passando a bomba a atuar com velocidade de 35 ml/min (fig. 15). Ao final do processo, o animal deve estar completamente enrijecido, o que denota o sucesso do procedimento.

As peças a serem estudadas devem ser removidas cuidadosamente (figs. 16-20) e mantidas em formaldeído 4%, por 6 horas em geladeira, para a realização da pós-fixação. Assim que pós-fixadas, são lavadas em PBS por 60 minutos com trocas a cada 10 minutos, para início do processo de descalcificação.

Prancha ilustrativa perfusão

Prancha ilustrativa perfusão

Prancha ilustrativa perfusão

Prancha ilustrativa perfusão

Protocolo de reação imunoistoquímica em tecido ósseo.

Tanto a fixação como a descalcificação são necessárias para a realização de técnicas histológicas convencionais ou imunoistoquímica. No entanto, estes processos podem causar desnaturação de proteínas encontradas nos tecidos, resultando na redução da atividade enzimática e imunoreatividade. A escolha de um material seguro, que apresente respaldos junto à literatura, é um dos critérios essenciais para o sucesso do processo. Optamos pelo uso do EDTA (fig.21) na concentração de 5%, pH 7,0, por um período de 42 dias com trocas semanais, em temperatura ambiente.

Testes de dureza eram realizados nas peças utilizando-se de agulhas finas que perfuravam as mesmas, que deveriam apresentar-se flexíveis e não retentivas. Uma vez descalcificadas, as peças eram submetidas a lavagem em PBS (fig. 22) por 24 horas com trocas alternadas, com a finalidade de remover resíduos de descalcificador.

A crioproteção é feita imergindo as peças em solução de sacarose 30% (Merck), por 3 dias, mantidos em geladeira. O processo de crioproteção se faz necessário para que a solução de sacarose penetre nos tecidos de forma homogênea, impedindo a formação de bolhas de ar no interior da peça, o que causaria danos aos tecidos durante a microtomia.

A microtomia foi realizada em criostato (Micron, Zeiss – fig. 23). As

peças foram fixadas em suporte metálico e incluídas utilizando TissueTek® (fig.24). Foram obtidos cortes em sentido longitudinal e transversal (figs. 25 e 26) com 14 µm de espessura. As lâminas eram mantidas em freezer convencional. Uma vez os cortes montados em lâminas as reações podem ser iniciadas.

Como anticorpo primário foram utilizados a Osteoprotegerina -OPG (Rabbit anti-opg - Santa Cruz Biotechnology – SC11383), RANK (Rabbit anti-rank - Santa Cruz Biotechnology – SC9072 – fig. 27) e RANKL (Goat anti-rankl - Santa Cruz Biotechnology – SC7627). Os anticorpos secundários foram anti-coelho biotilado produzido em burro (Biotin-SP-AffiniPure donkey anti-rabbit IgG - Jackson Immunoresearch Laboratories – 711.065.152 – fig. 28) e anti-cabra biotilado produzido em burro (Biotin-SP-AffiniPure donkey anti-goat IgG - Jackson Immunoresearch Laboratories – 705.065.147).

A padronização do protocolo de reação imunoistoquímica em tecido ósseo, consiste na seguinte seqüência:

- 1- Lavagem das lâminas com PBS em 3 séries de 10 minutos cada;
- 2- Inibição da peroxidase endógena utilizando 500µl de água oxigenada (H₂O₂) 30% em 50 ml de PBS, por 30 minutos, sob agitação, a temperatura ambiente;
- 3- Lavagem das lâminas com PBS em 3 séries de 10 minutos cada;

4- Bloqueio das reações inespecíficas (blocking) utilizando Soro normal de burro 5% (fig. 29) diluído em loaded 0,3% (PBS + Triton X-100 0,3%), por 60 minutos, em repouso, a temperatura ambiente;

5- Lavagem das lâminas com PBS por 10 minutos;

6- Incubação do anticorpo primário na concentração de 1:100 para OPG, RANK e RANKL, overnight, em repouso e em meio úmido, a temperatura ambiente;

7- Lavagem das lâminas com PBS em 3 séries de 10 minutos cada;

8- Incubação do anticorpo secundário Donkey α -rabbit e Donkey α -goat na concentração de 1:200, por 120 minutos, em repouso e em meio úmido, a temperatura ambiente ;

9- Lavagem das lâminas com PBS em 3 séries de 10 minutos cada;

10- Incubação do complexo avidina-biotina (Kit ABC- Vectastain Elite ABC – Peroxidase Standard, reagent A and B only – PK6100 – Vector Laboratories – fig. 30) utilizando 10 μ l da solução A e 10 μ l da solução B, diluídos em 980 μ l de PBS, por 60 minutos, em repouso e em meio úmido, a temperatura ambiente;

11- Lavagem das lâminas com PBS em 3 séries de 10 minutos cada;

12- Revelação da reação utilizando 5mg de Diaminobenzidina (DAB- Sigma, St. Louis, MO, EUA – fig. 31) diluídos em 10 ml de PBS e ativados com 3 μ l de H₂O₂. A revelação é controlada macro e microscopicamente.

A reação é bloqueada quando as lâminas são lavadas em PBS. Após o término da reação, as lâminas permanecem à temperatura ambiente, onde, após secagem completa, os cortes são desidratados em série crescentes de álcool, imersos em xilol e montadas com lamínulas utilizando permount como meio de montagem.

Prancha ilustrativa protocolo

Prancha ilustrativa protocolo

ANEXO B – Receitas das soluções utilizadas.

A-) TAMPÃO FOSFATO - PB 0,2 M – pH 7,4

- 500 ml de DH₂O
- 3,17g de fosfato sódico monobásico (Peso molecular: 137,99 g/mol – Merck)
- 13,7 g de fosfato sódico dibásico (Peso molecular: 177,99 g/mol - Merck)

* Colocar aproximadamente 400ml de H₂O deionizada e dissolver a solução A e depois a solução B. Agitar até dissolver. Acrescentar água até completar 500 ml.

B-) TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO - PBS – pH 7,4

- 100ml de PB 0,2M
- 17,52 grs. de NaCl
- 400 mg de KCl
- 1900 ml de MiliQ

* Receita para 2 litros de PBS. Colocar aproximadamente 1700 ml de DH₂O e adicionar o NaCl e o KCl. Agitar até dissolver. Acrescentar o PB 0,2M. Agitar. Acrescentar água até completar 2 litros.

C-) SOLUÇÃO SALINA

- 1 litro de DH_2O
- 9g de NaCl

* Colocar aproximadamente 900 ml de DH_2O e adicionar o NaCl. Agitar até dissolver. Adicionar água até completar 1 litro.

D-) FORMALDEÍDO 4% - pH 9,5

- 1 litro de DH_2O
- 4 g de NaOH
- 40 g PFA
- 38,14 g Tetraborato de sódio (TBS)

* Preparar 1 dia antes de ser usado. Aquecer aproximadamente 500ml de H_2O até atingir 60°C . Acrescentar o NaOH e aguardar dissolver. Acrescentar o PFA lentamente e aguardar dissolver. Por último acrescentar-se o bórax. Agitar até dissolver completamente. Completar o volume até o total de 1 litro. Filtrar e armazenar em geladeira.

E-) EDTA 5%

- 100 ml de D H₂O
- 5 g de EDTA

* Colocar aproximadamente 80ml de DH₂O e adicionar 5g de EDTA. Agitar por aproximadamente 30 minutos. Acrescentar água até completar 100 ml.

F-) SACAROSE 30%

- 100 ml de D H₂O
- 30 g de Sacarose (Merck)

* Colocar aproximadamente 80ml de DH₂O e adicionar 5g de EDTA. Agitar por aproximadamente 30 minutos. Acrescentar água até completar 100 ml.

G-) GELATINA

- 500 ml de D H₂O
- 5 g de gelatina
- 0,5 g de cromo potássio sulfato

* Colocar a água para aquecer até atingir 70-80°C. Acrescentar o cromo potássio sulfato. Agitar até dissolver. Em seguida acrescentar a gelatina devagar. Agitar até dissolver. Filtrar.

ANEXO C – Ilustração da técnica de extração dental em ratos.

**ANEXO D - Autorização da Comissão de Ética na
Experimentação Animal.**

Autorizo a reprodução deste trabalho.
Araçatuba, 19 de dezembro de 2005.

Carolina Chiantelli Cláudio Coutinho