



Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araçatuba

KÁTIA REGINA COIMBRA TOBIAS

**Imunomarcção para TRAP em tecido de reparação óssea
de Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) tratados
com Atenolol**

**Araçatuba-SP
2017**

KÁTIA REGINA COIMBRA TOBIAS

**Imunomarcção para TRAP em tecido de reparação óssea
de Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) tratados
com Atenolol**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Odontológica – Área de Concentração: Saúde Bucal da Criança.

Orientadora: Prof^a. Ass. Dra. Cristina Antoniali Silva

**Araçatuba-SP
2017**

Catálogo-na-Publicação

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

T629i Tobias, Kátia Regina Coimbra.
Imunomarcção para TRAP em tecido de reparação óssea de Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) tratados com Atenolol / Kátia Regina Coimbra Tobias. - Araçatuba, 2017
41 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Cristina Antoniali Silva

1. Hipertensão 2. Ratos Endogâmicos SHR 3. Atenolol
4. Cirurgia bucal 5. Imuno-histoquímica I. Título

Black D27
CDD 617.645

Dedico este estudo com muito amor e carinho

A minha família pelo amor e incentivo em todos os momentos.

A minha querida mãe Lady Coimbra Tobias pelo amor incondicional em toda minha vida onde tenho muita gratidão meu MUITO OBRIGADO.

A minha amada filha Anny Isabelly Coimbra Lages pela compreensão e suportar minhas ausências com muita paciência e compreensão te AMO FILHA.

Aos meus irmãos Rosângela Coimbra Tobias, Patricia Coimbra Tobias, Klevina Maria Tobias Coimbra e Jonatas Coimbra Tobias pelo apoio de sempre em vários momentos

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus por todos os momentos e realizações.

À minha orientadora Profa. Dra. Cristina Antoniali Silva, por todos os ensinamentos recebidos, e pela disponibilidade em me orientar, sou eternamente agradecida.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP), pela oportunidade de estudar nessa instituição incrível e comprometida com a ciência.

Ao Centro Universitário São Lucas (UNISL) pela oportunidade de crescimento profissional, por meio da Dra. Eliza Aguiar, Dra. Eloá Gazola, e Dr Ricardo Pianta responsáveis pelo intercâmbio do Doutorado Interinstitucional (DINTER).

A todos os meus colegas do Centro Universitário São Lucas – UNISL de Porto Velho/RO que me incentivaram a participar desse programa de pós-graduação.

As minhas coordenadoras do Centro Universitário São Lucas-UNISL, prof.^a. Iracema, Jandra, Denise e Flávia pelo apoio e compreensão durante as minhas ausências para o doutorado.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Odontológica do DINTER pelos ensinamentos recebidos: Prof.^a. Cristina Antoniali Silva, Prof. Célio Percinoto, Prof. Juliano Pelim Pessan, Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra, Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof. Robson Frederico Cunha, Prof. Eloi Dezan Junior, Prof.^a. Débora Barros Barbosa, Prof.^a. Mirela Sanae Shinohara, Prof João Eduardo Gomes Filho, Prof.^a. Denise Pedrini, Profa. Lucianne Cople Maia e Prof. Heitor Marques Honório.

A Professora Roberta Okamoto pela paciência e pela clareza para transmitir conhecimentos, muito obrigado.

A Natalia Manrique Cursino por iniciar esse lindo trabalho, meu muito obrigado.

Aos Colegas de laboratórios Murilo, Jessica e Simone pela ajuda em muitos momentos.

Aos funcionários da Biblioteca da UNESP, em especial à Ana Cláudia, que sempre me atenderam com muita atenção, eficiência e paciência.

A minha amiga Gleicianny pelo apoio, pelo incentivo e por todas as orações em meu favor mesmo distante.

Aos meus familiares, amigos e alunos pelo carinho e pela compreensão durante as minhas ausências.

Aos meus colegas de curso: Luna, Dino, Ana Giselle, Isabel, Gustav, Jaime, Maria Rosa, Paulo, Rainier e Rui pela parceria, amizade e por todos os momentos maravilhoso que passamos juntos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Valéria Queiroz Marcondes Zagatto, Cristiane Regina Lui Mattos, Liliam Sayuri Mada pelo excelente trabalho e atenção prestada.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente participaram ou influenciaram na realização desse trabalho e que não foram citados.

“Há tanta suavidade em nada dizer e tudo se entender.”

Fernando Pessoa

Tobias KRC. Imunomarcção para TRAP em tecido de reparação óssea de Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) tratados com Atenolol [tese]. Araçatuba: UNESP- Universidade Estadual Paulista; 2017.

RESUMO

Introdução: A hipertensão arterial tem sido um dos maiores problemas de saúde no mundo, com grandes alterações para as doenças cardiovasculares e renais. O tecido ósseo tem função importante no suporte, proteção e locomoção e está sob o controle de fatores sistêmicos como hormônios e fatores locais, entre eles os fatores de crescimento e citocinas. A Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (TRAP) é uma enzima que faz parte da família das fosfatases ácidas e apresenta localização intracelular; mais especificamente dentro do compartimento lisossomal de osteoclasto, macrófagos e células dendríticas, tem sido utilizada como um marcador histoquímico da atividade osteoclástica. **Objetivos:** Avaliar a expressão da proteína TRAP em alvéolos dentários de ratos hipertensos (SHR) e normotensos tratados ou não com atenolol. **Métodos:** Neste estudo foram utilizados 4 grupos de ratos sendo: 1) W (wistar sem tratamento), 2) WT (wistar tratado com atenolol), 3) S (SHR sem tratamento) e 4) ST (SHR tratado com atenolol), submetidos a exodontia do incisivo superior direito, com eutanásia no 7º, 14º, 21 e 28º dia pós-operatório. A análise dos mecanismos biológicos envolvidos no processo de reparo alveolar foi obtida pela análise da expressão de proteínas TRAP por meio da técnica de imunohistoquímica. Os resultados foram analisados pela média e erro padrão da média e aplicado o teste paramétrico ANOVA, com *pos-test* de Tukey para avaliar os períodos dentro de cada grupo e entre os grupos, sendo consideradas as diferenças significativas quando $p < 0,05$. **Resultados:** Os resultados mostraram que a marcação TRAP aumenta em alvéolo dentais de ratos Wistar durante todos os períodos pós – operatórios. A marcação TRAP aumenta apenas ao 14º nos dias de reparação alveolar em alvéolo dental de SHR não tratados. O atenolol não altera o processo de reparo alveolar em ratos Wistar, porém o atenolol promoveu a redução da marcação de TRAP em SHR ao 14º dia. **Conclusão:** A hipertensão aumenta a expressão da proteína TRAP no 14º dia pós-cirúrgico de reparação alveolar e o atenolol promove redução da marcação aumentada de TRAP ao 14º dia pós-cirúrgico em alvéolos de SHR.

Palavras-chave: Hipertensão. Ratos Endogâmicos SHR. Atenolol. Cirurgia bucal. Imuno-histoquímica. TRAP.

TOBIAS, KRC. Immunostaining for TRAP in bone healing tissue of Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) treated with Atenolol [thesis]. Araçatuba: UNESP- São Paulo State University; 2017.

ABSTRACT

Introduction: Arterial hypertension has been one of the world's biggest health problems, with considerable alterations for cardiovascular and renal diseases. The bone tissue has an important role in support, protection and locomotion and is controlled by systemic factors like hormones and local factors, such as growth factors and cytokines. The Tartrate-resistant Acid Phosphatase (TRAP) is an enzyme that belongs to the Acid Phosphatases family and has an intracellular location, more specifically inside the lysosomal compartment of osteoclasts, macrophages and dendritic cells. It has been used as a histochemical marker of the osteoclast activity.

Objectives: Evaluate TRAP protein's expression in the dental alveoli of normotensive and hypertensive rats (SHR) treated or not treated with Atenolol.

Methods: In this study, four groups of rats were used: 1) W (with no treatment), 2) WT (wistar treated with Atenolol), 3) S (SHR without treatment) and 4) ST (SHR treated with Atenolol), all of which underwent exodontia of the upper right incisor with euthanasia on the 7th, 14th, 21st and 28th day after the operation. The analysis of the biological mechanisms involved in the process of alveolar repair was obtained by the expression of TRAP proteins in the alveolar process through an immunohistochemistry technique. The results were analyzed through the average and its standard error. The parametric test ANOVA was applied with Tukey's post-test were applied to evaluate the periods within each group and between the groups, considering the significant differences when $p < 0,05$. **Results:** The results demonstrated that TRAP staining increases in the dental alveoli of Wistar rats during all the post-surgical periods. TRAP staining increases only on the 14th day of alveolar recovery in the dental alveoli of non-treated SHR. Atenolol does not change the process of alveolar repair in Wistar rats, but Atenolol promoted the reduction of TRAP staining among SHR on the 14th day. **Conclusion:** Hypertension increases the expression of TRAP proteins on the 14th alveolar recovery postsurgical day and Atenolol promotes the reduction of the increased TRAP staining on the 14th postsurgical day in SHR's alveoli.

Key words: Hypertension. Inbred SHR rats. Atenolol. Oral surgery. Alveolar repair. Immunohistochemistry. TRAP.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sequência das etapas da exodontia: A- anti-sepsia, B- 23
posicionamento do instrumento, C -luxação, D e E- exodontia,
F- ferida cirúrgica já suturada (retirado de Manrique, 2010).
- Figura 2 – Análise da imunomarcção para TRAP durante o processo de 27
reparo alveolar (7 a 28 dias) em alvéolos dentais de ratos
Wistar. As barras representam a média \pm EPM dos valores
obtidos (n=6). *p<0.05 W 14 x outros grupos, $^{\alpha}$ <0.05 W 21 x
W 7, $^{\beta}$ <0.05 W 28 x W 7.
- Figura 3 – Análise da imunomarcção para TRAP durante o processo de 28
reparo alveolar (7 a 28 dias) em alvéolos dentais de ratos
SHR. As barras representam a média \pm EPM dos valores
obtidos (n=6). *p<0.05 SHR14 x SHR 7 e SHR 21
- Figura 4 – Análise da imunomarcção para TRAP durante o processo de 29
reparo alveolar (7 a 28 dias) em ratos Wistar Controle (W e
Wistar Tratado (WT). As barras representam a média \pm EPM
dos valores obtidos (n=6). *p<0.05 WC 14 x outros grupos,
 $^{\alpha}$ <0.05 WT 21 x WC 28.
- Figura 5 – Análise da imunomarcção para TRAP durante o processo de 30
reparo alveolar (7 a 28 dias) em ratos SHR Controle (S e
SHR Tratado (ST). As barras representam a média \pm EPM
dos valores obtidos (n=6). *p<0.05 SC14 x outros grupos,
 $^{\alpha}$ <0.05 ST14 x SC14.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C = grau Celsius
% = Por cento
ANOVA = análise da variância
DES = desmineralização
Dr. = doutor
Dra. = doutora
DCV = doenças cardiovasculares
et al. = e colaboradores
FOA = Faculdade de Odontologia de Araçatuba
UNESP = Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Vol. = volume
± = Desvio padrão
< = Menor
> = Maior
cm = centímetro
DAB = diaminobenzidina
DMO = densidade Mineral
H₂O₂ = peróxido de hidrogênio
EPM = erro padrão da média
Fig. = figura
g = grama
h = hora
HE = hematoxilina e eosina
Kg = quilo grama
LTDA = limitada
M-CSF = fator estimulador de colônias de macrófago
Mg = miligrama
mL = mililitro
mmHg = milímetros de mercúrio
n = tamanho da amostra
OPG = Osteoprotegerina
PAS = Pressão Arterial Sistólica
PBS = Tampão fosfato salina
RANK = receptor ativador Nuclear kappa-β
RANKL = receptor ativador Nuclear kappa-β ligante
SHR = Ratos Espontaneamente Hipertensos
S= Ratos Espontaneamente Hipertensos não tratados
ST = Ratos Espontaneamente Hipertensos Tratados com atenolol
TRAP = Fosfatase Ácida Tartarato – Resistente
Unesp = Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
W = ratos Wistar
WT = Wistar Tratado
µm = micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 PROPOSIÇÃO	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Animais.....	21
3.2 Medida de pressão arterial (PA).....	21
3.3 Grupos experimentais	22
3.4 Tratamento	22
3.5 Cirurgia e Eutanásia	22
3.6 Processamento histológico.....	24
3.7 Análise Imunoistoquímica.....	24
3.8 Análise Estatística	25
4 RESULTADOS	27
4.1 A marcação TRAP aumenta em alvéolo de ratos Wistar durante os períodos pós - operatórios	27
4.2 A marcação TRAP aumenta apenas ao 14 ^o dia de reparação alveolar em alvéolo dental de SHR sem tratamento	28
4.3 O atenolol não altera o processo de reparo alveolar em ratos Wistar.....	28
4.4 O atenolol promoveu a redução da marcação de TRAP em SHR ao 14 ^o dia.....	29
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	37
ANEXO.....	41

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão é uma das desordens mais prevalentes em todo o mundo e é caracterizada por pressão sanguínea muito elevada nas artérias (GUYTON, 2006). A pressão arterial pode ser considerada normal quando a pressão máxima (sistólica) for igual ou inferior a 130 mmHg e, a pressão mínima (diastólica) for igual ou inferior a 85 mmHg. Portanto, o estado hipertensivo pode ser caracterizado quando o valor da pressão sistólica for igual ou superior a 140 mmHg, e o da diastólica for igual ou superior a 90 mmHg (BAKRIS et al., 2008; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016).

Doenças cardiovasculares (DCV) são causadas por alterações patológicas no coração e vasos sanguíneos, abrangendo uma variedade de doenças dentre elas: a doença arterial coronária, cerebrovascular, hipertensão arterial, doença arterial periférica, entre outras (GRADIZ, 2007). O nível de pressão arterial de qualquer indivíduo é determinado pela interação de múltiplos fatores genéticos, ambientais e demográficos. Estes mecanismos constituem alterações dos processos de regulação fisiológica normal da pressão arterial (COTRAN et al. 2008; TORTORA, 2007). Existem determinados fatores de risco que estão associados à hipertensão, como por exemplo, a alimentação rica em sal, o sedentarismo e a síndrome metabólica (obesidade, dislipidemia e diabetes). É possível distinguir duas formas de hipertensão: a hipertensão primária ou essencial, cuja causa é desconhecida (cerca de 90 a 95% dos casos), e a hipertensão secundária, na qual é possível identificar uma patologia responsável (cerca de 5 a 10% dos casos) (TORTORA, 2007).

Em 1963, Okamoto e Aoki introduziram um novo modelo experimental de hipertensão, sem que nenhum recurso fisiológico, farmacológico ou cirúrgico fosse necessário. Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) foram desenvolvidos pelo cruzamento entre ratos de uma mesma ninhada, de uma linhagem de ratos Wistar da cidade de Kyoto, que apresentavam alteração de pressão arterial, resultando em quase 100% de descendentes hipertensos (OKAMOTO e Aoki., 1963). Desde então, o SHR é reconhecido como um modelo experimental de hipertensão essencial e pode ser comparado à hipertensão essencial humana (FAZAN et al., 2006).

A semelhança entre a hipertensão humana e a observada em SHR, inclui: a) a predisposição genética para hipertensão sem etiologia específica, b) o aumento da resistência periférica total sem expansão de volume e, c) igual resposta a tratamento com drogas (TRIPPODO; FROHLICH, 1981; UNDEFREIND; SPECTOR, 1972). Por apresentar um relativo curto período de vida, ser pequeno, ter relativamente baixo custo, e ser de fácil manutenção em biotério, os SHR são utilizados para estudo da história natural, determinantes genéticos e alterações fisiopatológicas da doença hipertensiva. SHR são considerados animais osteopênicos, uma vez que apresentam alta taxa de remodelação do esqueleto, com predomínio da reabsorção óssea sobre o processo de neoformação óssea (FAZAN et al., 2006).

O tecido ósseo tem papel importante no suporte, na proteção, na locomoção e está sob o controle de fatores sistêmicos, como os hormônios e de fatores locais, como os fatores de crescimento e citocinas (ANDIA et al., 2006). Portanto, os sistemas imune e esquelético encontram-se intimamente relacionados; a esta área interdisciplinar de estudo nomeou-se de osteoimunologia (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). A homeostase do sistema esquelético está na dependência de remodelação óssea equilibrada, ou seja, da dinâmica balanceada entre a atividade dos osteoblastos - células de formação - e a atividade de osteoclastos - células de reabsorção óssea (TAKAYANAGI, 2005). Esse balanço é firmemente controlado por alguns sistemas regulatórios, como o sistema imune. Se esse balanço inclina-se a favor dos osteoclastos, ocorrerá reabsorção patológica como nas periodontites, artrites reumatóides e doenças osteoporóticas (TAKAYANAGI, 2005).

O reparo tecidual consiste na capacidade que o organismo possui de reparar danos decorrentes de agentes tóxicos ou processos inflamatórios (MUNDY, 1991; NOBRE et al., 2008). O tecido ósseo tem capacidade para reparação em resposta a uma lesão ou tratamento cirúrgico, esse processo envolve uma complexa integração de células, fatores de crescimento e matriz extracelular.

O reparo ósseo é um processo regenerativo complexo que inclui: a interação de uma série de eventos biológicos, expressão de genes e a ação de um grande número de células e proteínas que determinarão a restauração da integridade do tecido (COTRAN et al., 2008; TORTORA, 2007). Relatos de Leibbrandt e Penninger

(2008) têm levado a uma melhor compreensão dos mecanismos e proteínas envolvidas na reparação óssea. Sabe-se que esse processo é controlado por um sistema composto por três proteínas: RANK (receptor do ativador do fator nuclear kappa beta), seu ligante RANKL (ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa beta) e o competidor natural OPG (osteoprotegerina) (FERNANDES et al., 2014). As interações existentes entre essas proteínas em células precursoras de osteoclastos atuam como principais mecanismos moleculares, pelos quais é desencadeado o processo de reabsorção óssea. Desencadeiam séries de cascatas de sinalizações intracelulares que resultam na ativação de fator nuclear kappa beta (NF-kB) (WADA et al., 2006). O NF-kB é um fator de transcrição pleiotrópico que promove a expressão de vários genes responsáveis pela diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos e, também, na ativação de osteoclastos maduros que, por sua vez, sintetizam vários mediadores; entre eles, a fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) (SOYSA; ALLES, 2009). Estudos realizados por Hayman (2008) mostraram que TRAP tem função fundamental no processo de síntese e processamento de colágeno tipo I um dos principais componentes da matriz óssea, sendo utilizada como um marcador histoquímico da atividade osteoclástica.

Os antagonistas dos receptores beta-adrenérgicos formam uma importante categoria de drogas. Foram descobertos em 1958, 10 anos depois de Ahlquist (1948) ter postulado a existência das subclasses alfa e beta de receptores adrenérgicos (BRISTOW et al., 1986). O propranolol, a droga mais utilizada dessa classe, exerce efeito bloqueador igual sobre os receptores beta 1 e beta 2 (BRISTOW et al., 1986). As vantagens clínicas potenciais de drogas com algumas atividades agonistas parciais e com seletividade pelos receptores beta 1, estimularam o desenvolvimento do practolol (seletivo para receptores beta 1 e agonista parcial muito fraco) todavia, seu uso clínico foi abandonado em virtude de sua toxicidade. O bloqueio dos receptores alfa pré-sinápticos e sobre a liberação de noradrenalina também pode contribuir para o efeito anti-hipertensivo (FAZAN et al., 2006; MEDEIROS et al., 2013; NETO et al., 2006; RANG; DALE, 1993).

O processo de reparo alveolar é denominado como um conjunto de reações teciduais ocorridas no interior do alvéolo após a extração dental. TRAP é uma enzima que faz parte da família das fosfatases ácidas e apresenta localização

intracelular; mais especificamente dentro do compartimento lisossomal de osteoclasto, macrófagos e células dendríticas. A enzima possui importante participação em processos biológicos que incluem o desenvolvimento do esqueleto, porque apresenta efeito negativo sobre a atividade de osteoblastos e é essencial para atividade de reabsorção desempenhada pelos osteoclastos. Assim, TRAP apresenta função fundamental no processo de síntese e processamento de colágeno tipo I, componente participante da matriz óssea. Essa enzima também tem efeito na mineralização do tecido ósseo por degradar osteopontina e, devido a todas essas atividades sobre o tecido ósseo, a TRAP tem sido utilizada como marcador histoquímico da atividade osteoclástica (HABERMANN et al., 2007). TRAP também é reconhecida como uma molécula de ocorrência generalizada com funções tanto no esqueleto, como no sistema imunitário (BASTOS et al., 2013; ELIAS et al., 2006; FERNANDES et al., 2014; HAYMAN, 2008; LIMA et al., 2008).

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi determinar a expressão de TRAP, por análise imunohistoquímica, em alvéolos dentais de ratos normotensos e SHR quando submetidos ou não ao tratamento com atenolol.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos desenvolvidos foram previamente aprovados pelo comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da FOA, Campus de Araçatuba, UNESP, de acordo com o protocolo no 2008-001397 (Anexo A).

3.1 Animais

Foram utilizados 24 ratos SHR e Wistar (controle) pesando entre 180 e 230g, de 2 e 3 meses, de uma cepa mantida no Biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – Unesp. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22-24^o C) com ciclo de luz (12h/luz e 12h/escuro) no Biotério do Departamento de Ciências Básicas e foram alimentados com água potável e ração *ad libitum*. Somente SHR com pressão arterial sistólica maior ou igual a 150 mmHg e ratos normotensos Wistar com pressão arterial sistólica em torno de 112 mmHg foram utilizados nos experimentos (MANRIQUE, 2010).

3.2 Medida de pressão arterial (PA)

O registro da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizado pelo método indireto de pletismografia de cauda, com a utilização de pletismógrafo adaptado para medidas em ratos. A PAS foi aferida nos períodos pré-operatório e pós-operatório em dias determinados nos diferentes grupos experimentais.

3.3 Grupos experimentais

Os ratos foram divididos em quatro grupos experimentais: 1) W (wistar sem tratamento), 2) WT (wistar tratado com atenolol), 3) S (SHR sem tratamento) e 4) ST (SHR T tratado com atenolol). Para cada grupo, foram avaliados seis (6) animais em 4 diferentes tempos após a exodontia: 7, 14, 21, 28 dias.

3.4 Tratamento

Ratos Wistar e SHR foram tratados com o anti-hipertensivo atenolol na dose de 100mg/kg/dia por via oral. O tratamento foi iniciado sete (7) dias antes de ser realizada a exodontia e foi mantido após a cirurgia até os períodos determinados para o sacrifício (7, 14, 21, 28 dias). O atenolol foi diluído em volume de água pré-determinado (50 a 60ml de água/dia) a ser ingerido durante 24 horas (um dia) pelo rato. Os ratos W e SHR (não tratados) receberam o mesmo volume de água sem a adição de atenolol.

3.5 Cirurgia e Eutanásia

Os animais foram anestesiados com administração intramuscular da associação de 50mg/kg cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas São Paulo, Brasil) e 10mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda. – Osasco, São Paulo, Brasil) e submetidos à cirurgia para exodontia do dente incisivo superior direito seguindo a técnica padronizada por Okamoto e Russo (1973). As bordas das feridas cirúrgicas foram suturadas com fio cirúrgico estéril e absorvível Vycril 5-0 (poliglactina 910) Ethicon®. As etapas da cirurgia foram apresentadas em sequência de imagens na figura 1. Todos os animais receberam 0,2 mL de Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte (1,7g/3mL Fort DODGE®) administrado por via intramuscular.

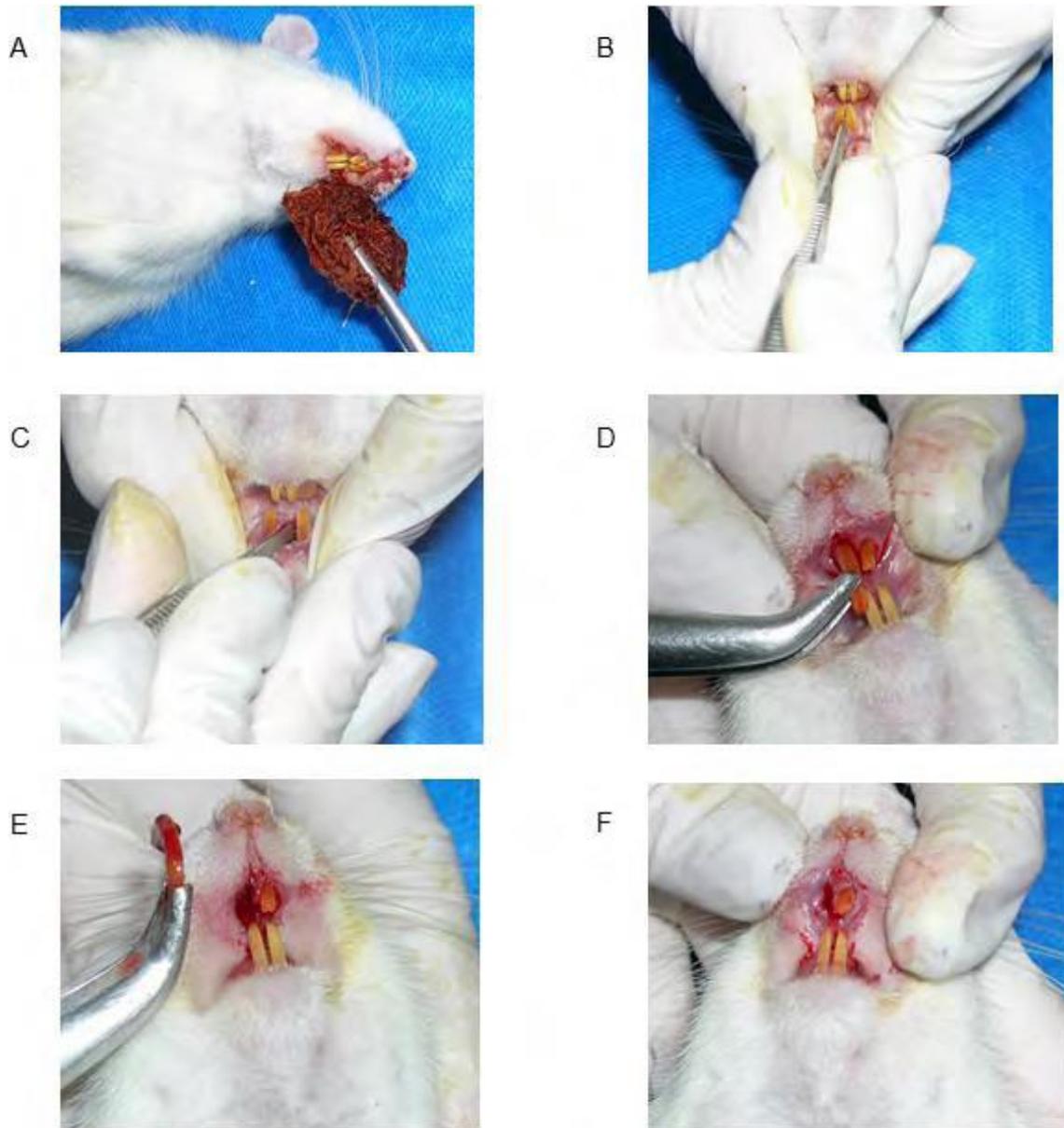


Figura 1 - Sequência das etapas da exodontia: A- anti-sepsia, B- posicionamento do instrumento, C -luxação, D e E- exodontia, F- ferida cirúrgica já suturada (retirado de Manrique, 2010).

Os ratos foram sacrificados em câmara saturada com halotano nos diferentes dias pós-cirúrgicos. Em seguida, a hemi-maxila direita foi separada da esquerda, por meio da incisão sagital mediana que acompanha a sutura intermaxilar. Foram obtidas as peças dos alvéolos após cortes com tesoura reta tangenciando a face distal dos molares. As peças foram colocadas em solução de formalina tamponada 10%, pH=7, por 24 horas (MANRIQUE, 2010).

3.6 Processamento histológico

Foram obtidas as peças dos alvéolos após cortes, e após estes períodos as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas e então iniciou-se a descalcificação seguindo técnica previamente padronizada.

Para a descalcificação das peças foi utilizada solução de EDTA 4,13% (Preparo da solução de EDTA: em um litro de tampão fosfato, pH 7,2, diluir os solutos EDTA (41,3 g) e NaOH (4,4 g)). As peças foram colocadas individualmente em frascos plásticos com solução de EDTA e mantidos sob refrigeração em geladeira a 4°C. A solução de EDTA foi trocada semanalmente durante todo o período de descalcificação (aproximadamente sete semanas) até que fosse identificada a descalcificação necessária. Esta identificação foi feita por método mecânico simples (penetração, sem resistência, de uma agulha anestésica odontológica na peça anatômica). Em seguida, as peças descalcificadas passaram pelo processo de diafanização, realizado seguindo a sequência de álcoois e xilol descrita a seguir: álcool 70% - 1 hora, álcool 80% - 1 hora, álcool 90% - 13 horas, álcool 95% - 1 hora, álcool 100% (primeira etapa) – 1 hora, álcool 100% (segunda etapa) – 1 hora, álcool 100% (terceira etapa) – 1 hora; álcool associado à xilol – 20 minutos; xilol (passo I) – 20 minutos, xilol (passo II) – 20 minutos, e na sequência foram incluídas em parafina. Os cortes foram feitos com uma espessura de 5µm com navalhas de aço 18 cm (Leica).

3.7 Análise Imunoistoquímica

Para o processamento imunoistoquímico foi utilizado como anticorpo primário para a TRAP (Goat anti-trap - Santa Cruz Biotechnology, SC7626), PECAM (Goat anti-pecam - Santa Cruz Biotechnology, SC6840). Como anticorpos secundários utilizamos os anticorpos contra IgG de cabra biotilado (anti-Goat IgG-HRP, PIERCE). O método de detecção foi efetuado por imunoperoxidase e a 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) utilizada como cromógeno seguido pela contra-coloração nuclear com Hematoxilina de Harri's. Os

procedimentos de controle foram feitos pela omissão dos anticorpos primários (controle negativo).

Secções longitudinais de 5µm das peças anatômicas foram colocadas em lâminas histológicas e desparafinizadas de acordo com protocolo padrão. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada 3% (Perhidrol 30% H₂O₂ - MERCK) por 45 minutos. As secções sofreram recuperação antigênica por tampão citrato (pH 6,0 – 55°C) e posteriormente foram incubadas por 18h a 4°C com anticorpos primários específicos para as proteínas a serem analisadas e em concentrações previamente testadas e padronizadas. Após 18h as lâminas foram lavadas com PBS (3 banhos) e incubados com um segundo anticorpo biotinilado, por mais 1h à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas em PBS e re-incubadas com o complexo StreptAvidina-biotina (Strept ABCComplex/HRP-Dako) por 45min.

A quantidade de células marcadas para TRAP foi contada a fim de se avaliar possíveis alterações na expressão desta proteína em todo alvéolo dental nos diferentes períodos analisados. A análise foi realizada em microscópio óptico convencional por um único observador, previamente calibrado.

3.8 Análise Estatística

Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão da média (E.P.M) e analisados pelo *software* Graph Pad 3.0. Foi aplicado o teste paramétrico ANOVA, com *pos-test* de Tukey para avaliar as diferenças nos períodos dentro de cada grupo e entre os grupos de ratos tratados e não tratados, sendo consideradas as diferenças significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), dos valores obtidos nos diferentes experimentos realizados. A análise foi realizada para avaliarmos possíveis diferenças em cortes de alvéolo de ratos Wistar e SHR, e as alterações causadas nos tecidos pelo tratamento com atenolol.

4.1 A marcação TRAP aumenta em alvéolo de ratos Wistar durante os períodos pós - operatórios

Ao analisarmos o número de células marcadas para TRAP em cortes de alvéolo de ratos Wistar, os resultados (Fig.2) mostraram que aos 14 dias houve aumento significativo de imunomarcagem para TRAP em comparação aos outros períodos analisados. Foi observado também que aos 21 e 28 dias a marcação para TRAP estava aumentada em comparação com a observada aos 7 dias. Aos 21 e 28 dias houve uma redução da marcação TRAP em relação ao 14 dias.

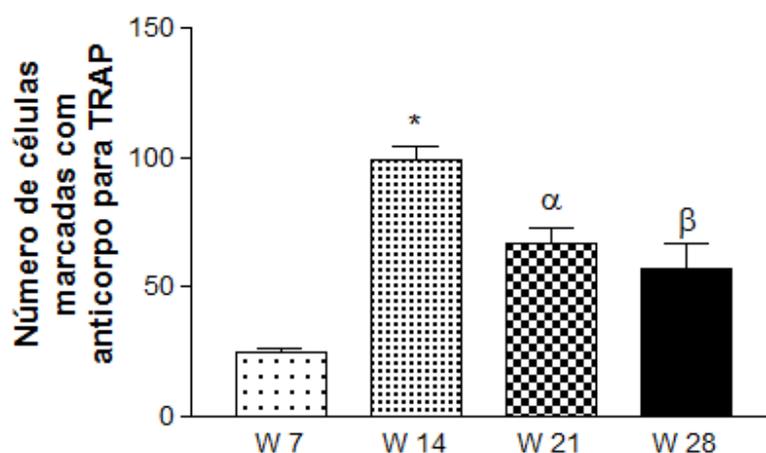


Figura 2 – Análise da imunomarcagem para TRAP durante o processo de reparo alveolar (7 a 28 dias) em alvéolos dentais de ratos Wistar (não-tratados). As barras representam a média \pm EPM dos valores obtidos (n=6). * $p < 0.05$ W 14 x outros grupos, ^α $p < 0.05$ W 21 x W 7, ^β $p < 0.05$ W 28 x W 7.

4.2 A marcação TRAP aumenta apenas ao 14º dia de reparação alveolar em alvéolo dental de SHR sem tratamento

Quando analisamos o número de células para TRAP em cortes de alvéolo de SHR sem tratamento observamos que apenas ao 14º dia pós-operatório houve aumento do número de células quando comparados aos 7 e 21 dias pós-operatório (Fig. 3).

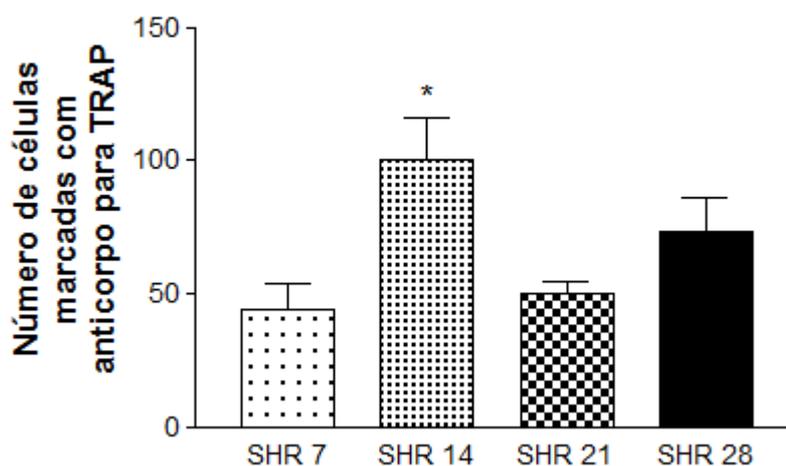


Figura 3 – Análise da imunomarcagem para TRAP durante o processo de reparo alveolar (7 a 28 dias) em alvéolos dentais de SHR. As barras representam a média ± EPM dos valores obtidos (n=6). *p<0.05 SHR14 x SHR 7 e SHR 21.

4.3 O atenolol não altera o processo de reparo alveolar em ratos Wistar

Quando comparamos o número de células marcadas para TRAP em cortes de alvéolo de ratos Wistar controle e Wistar tratado com atenolol aos 7, 14, 21 e 28 dias pós-operatórios, foi observado que ratos Wistar Controle apresentam ao 14º dia

pós-operatório maior imunomarcção quando comparamos aos outros grupos analisados (Fig. 4). O tratamento com atenolol não alterou a imunomarcção para TRAP em alvéolo dentais de ratos Wistar nos diferentes dias do processo (Fig. 4).

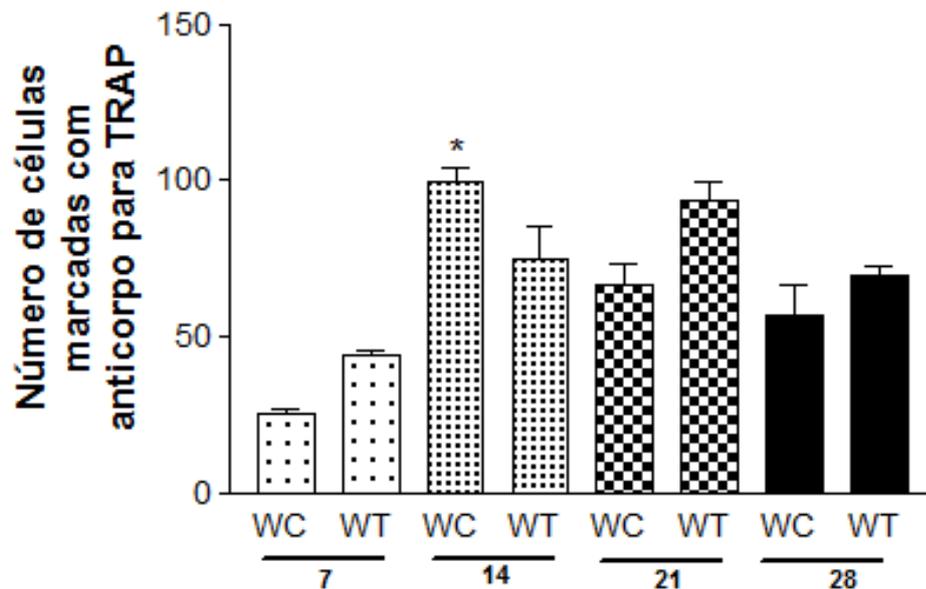


Figura 4 – Análise da imunomarcção para TRAP durante o processo de reparo alveolar (7 a 28 dias) em ratos Wistar Controle (WC, sem tratamento) e Wistar Tratado (WT). As barras representam a média ± EPM dos valores obtidos (n=6). *p<0.05 WC 14 x outros grupos, °p<0.05 WT 21 x WC 28.

4.4 O atenolol promoveu a redução da marcação de TRAP em SHR ao 14^o dia

Quando comparamos o número de células para TRAP em cortes do alvéolo de SHR-sem tratamento aos cortes de SHR tratados com atenolol observamos que o tratamento com atenolol promoveu redução da marcação para TRAP ao 14^o dia (Fig.5).

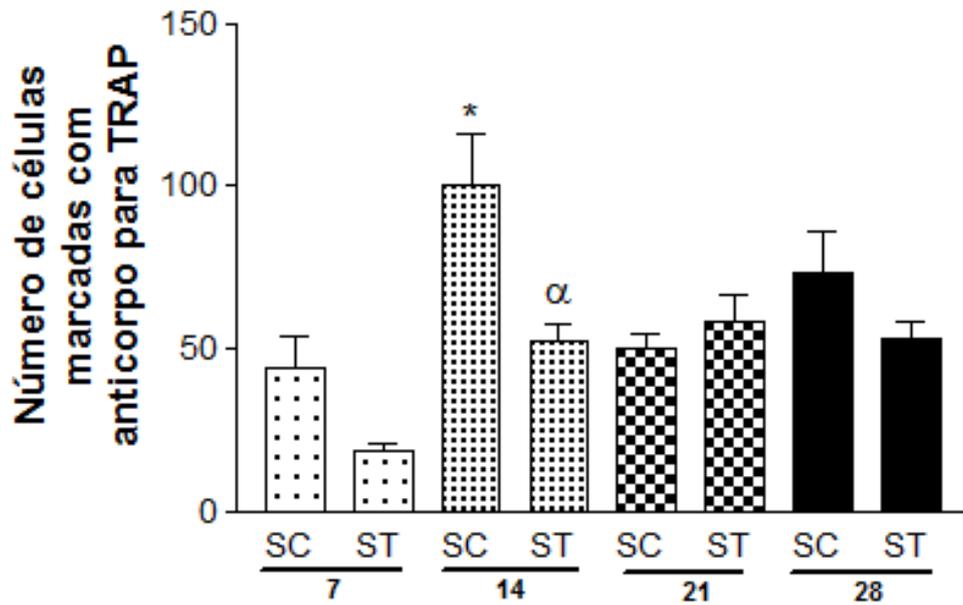


Figura 5 – Análise da imunomarcção para TRAP durante o processo de reparo alveolar (7 a 28 dias) em SHR Controle (SC) e SHR Tratado (ST). As barras representam a média \pm EPM dos valores obtidos (n=6). * $p < 0.05$ SC14 x outros grupos, $^{\alpha}p < 0.05$ ST14 x SC14.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Hipertensão arterial (HA) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por elevação sustentada dos níveis pressóricos ≥ 140 e/ou 90 mmHg (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016). Frequentemente, a hipertensão se associa a distúrbios metabólicos, alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo, sendo agravada pela presença de outros fatores de risco (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016). Em nosso estudo foram analisadas as imunomarcações para TRAP em alvéolos dentais de ratos SHR e Wistar com e sem tratamento com atenolol.

Estudo realizado por Manrique et al. (2012), mostrou não diferenças no padrão de expressão da OPG, RANKL e RANK nos diferentes períodos analisados em alvéolos de Wistar. No entanto, apesar de nenhuma alteração para OPG ser observada em alvéolos de SHR a marcação contra RANKL foi maior ao 28º dia em relação ao 21º dia pós-operatório, e em comparação à marcação ao 28º dia em alvéolos de ratos wistar. Associado ao aumento para RANKL, maior expressão de RANK foi observada em alvéolos de SHR aos 14º e 28º dias quando comparada aos alvéolos de ratos Wistar. A diferenciação e ativação de osteoclastos são coordenadas pela interação do receptor RANK como seu ligante RANKL, os quais são conhecidos por induzir reabsorção óssea fisiológica e patológica.

Em nosso estudo, quando comparamos o número de células com imunomarcação para TRAP de SHR sem tratamento, observamos um aumento na expressão da proteína aos 14º dias pós-cirúrgico, quando comparamos com os outros grupos analisados ($p < 0,05$), no entanto ao analisarmos SHR com tratamento, observamos que o atenolol promoveu uma redução de TRAP apenas no 14º dia pós-cirúrgico.

No estudo de Aitken et al. (2009) o tratamento com atenolol aumentou a imunomarcação de RANKL aos 21º e 42º dias, sem alterar a marcação desta proteína ao 28º dia em SHR. Marcações moderadas e intensas de RANKL foram observadas do 21º dia até o final do processo de reparo alveolar em SHR tratados com atenolol, o que não era observado em alvéolos de SHR não-tratados. O estudo realizado por Sato et al. (2010) mostrou haver maior concentração plasmática de

TRAP (marcador de osteoclastos) e intensa marcação de TRAP na superfície do osso trabecular de vertebrae lombares em SHR.

Luvizuto et al. (2011) investigaram a expressão de OPG, RANKL e TRAP durante o processo de cicatrização alveolar (7, 14, 21, 28 e 42 dias pós-operatórios) em ratos wistar ovariectomizadas tratadas com raloxifeno (OVX/RLX), para imunomarcação para TRAP. Aos 7 dias pós-operatórios a imunomarcação para TRAP não diferiu entre os grupos para a proteína TRAP, mas resultados diferentes foram encontrados em ratos wistar ovariectomizadas sem tratamento com raloxifeno onde observou-se uma maior expressão da proteína TRAP e RANKL. Aos 14 dias pós-operatório uma discreta imunomarcação para TRAP foi observada para os grupos sham e OVX / RLX. Os resultados deste estudo sugerem que o tratamento com raloxifeno pode compensar as alterações induzidas pela ovariectomia, reduzindo o número de pré-osteoclastos e osteoclastos maduros.

Em nosso estudo o número de células marcadas para TRAP em cortes de alvéolos de ratos Wistar mostraram que aos 14^o dias houve aumento significativo de imunomarcação para TRAP, já quando analisamos marcação TRAP em cortes de alvéolos dentais de SHR (sem tratamento) TRAP está aumentado apenas aos 14^o dia de reparação. Ao analisarmos o efeito do atenolol em cortes de alvéolos de ratos normotensos e Wistar tratados, percebemos que o atenolol não altera o processo de reparo alveolar, no entanto o atenolol promoveu a redução da marcação de TRAP em SHR aos 14 dias.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que:

- TRAP teve maior expressão no 14^a dia, após a extração dentária em tecido ósseo de ratos SHR e Wistar.
- Atenolol não alterou a expressão de TRAP no grupo Wistar, porém reduziu a expressão no 14^a dia de reparo ósseo em ratos SHR.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Ahlquist PH. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol.* 1948;153(3):586–600.
- Aitken SJ, Landao-Bassonga E, Ralston SH, Idris AI. β 2-adrenoreceptor ligands regulate osteoclast differentiation in vitro by direct and indirect mechanisms. *Arch Biochem Biophys.* 2009;482(1-2):96-103.
- Andia DC, Cerri PS, Spolidoro LC. Bone tissue: morphological and histophysiological aspects. *Rev Odontol UNESP.* 2006;35(2):191-8.
- Bastos MF, Vasconcelos de Araújo I, Vilhena Brilhante F, Pires AG, Dias Gonçalves TE, Napimoga MH, et al. Effects of lercanidipine on bone density and bone repair in spontaneously hypertensive rats. *Implant Dent.* 2013;22(1):49-54.
- Bakris G, Sowers J, Ferdinand K. Blood pressure control in the patient with difficult-to-control hypertension: which agent for which patient? *Prev Cardiol.* 2008;(1):42-49.
- Bristow MR, Ginsberg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, et al. et al. β 1 and β 2 adrenergic receptor subtype population in normal and failing human ventricular myocardium. *Circ Res.* 1986;59(3):297-309.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins: patologia estrutural e funcional.* 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
- Elias GP, Santos OA, Sasaki KT, Delbem AC, Antoniali C. Dental mineralization and salivary activity are reduced in offspring of spontaneously hypertensive rats (SHR). *J Appl Oral Sci.* 2006;14(4):253-259.
- Fazan VPS, Kalil ALR, Alcântara ACL, Genari AB, Tavares MR, Rodrigues AR, et al. Ratos espontaneamente hipertensos e neuropatias periféricas. *Medicina.* 2006;39(1):39-50.

Fernandes MS, Yanai MM, Martins GM, Iano FG, Leite AL, Cestari TM, et al. Effects of fluoride bone repair: an evaluation of RANKL, OPG e and TRAP expression. *Odontology*. 2014;102(1):22-30.

Gradiz R. Fisiopatologia do aparelho cardiovascular. In: Pinto AM, coord. *Fisiopatologia: fundamentos e aplicações*. Lisboa: Ed. Lidel; 2007. p. 355-386.

Guyton AC. *Fisiologia humana*. 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

Habermann B, Eberhardt C, Feld M, Zichner L, Kurth A. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) as a marker of osteoclast activity in the early phase after cementless total hip replacement. *Acta Orthop*. 2007;78(2):221-225.

Hayman AR. Tartrate – resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity*. 2008;41(3):218-223.

Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral. Texto-atlas-correlações clínicas*. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1143:123–150.

Lima V, Bezerra MM, Leitão RFC, Brito GAC, Rocha FAC, Ribeiro RA. Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da periodontite: papel de modeladores farmacológicos. *Rev Periodontia*. 2008;18(3):7-19.

Luvizuto ER, Dias SS, Okamoto T, Dornelles RC, Okamoto R. Raloxifeno therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. *Arch Oral Biol*. 2011;56(10):984-990.

Manrique N, Pereira CC, Garcia LM, Micaroni S, Carvalho AA, Perri SH, et al. Alveolar bone healing process in spontaneously hypertensive rats (SHR): a radiographic densitometry study. *J Appl Oral Sci*. 2012;20(2):222-227.

Manrique N. *Avaliação do Efeito do atenolol no processo alveolar em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) [dissertação]*. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba; 2010.

Medeiros JMV, Messoria MR, Fernandes PG, Novaes AB Jr, Palioto DB, de Moraes Grisi MF, et al. Arterial hypertension perpetuates alveolar bone loss. *Clin Exp Hypertens*. 2013;35(1):1-5.

Mundy GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J Periodontal Res*. 1991;26(3):213-217.

Neto MA, Rascado RR, Bendhack LM. Receptores β -adrenérgicos no sistema cardiovascular. *Medicina*. 2006;39(1):3-12.

Nobre MDP, Fernandes RG, Chin CM, Faig-Leite H. Ação local do alendronato sódico na reparação óssea de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). *Arq Bras Cardiol*. 2008;90(4):291-298.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963;27:282-293.

Okamoto K, Tabei R, Fukushima M, Nosaka S, Yamori Y, Ichijima K, et al. Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1966;30:703-716.

Rang HP, Dale MM. *Farmacologia*. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993.

Sato T, Arai M, Goto S, Togari A. Effects of propranolol on bone metabolism in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;334(1):99-105.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. 7ª Diretrizes Brasileira de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol*. 2016;107(3 Supp 3):1-83.

Soysa NS, Alles N. NF kappa beta functions in osteoclast. *Biochem Biophys Rev Commum*. 2009;378:1-5.

Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunogy. *J Periodontal Res*. 2005;40(4):287-293.

Tortora GJ. Principios de anatomia humana.10th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.

Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension: man and rat. *Circ Res.* 1981;48(3):309-319.

Udenfreind S, Spector S. Spontaneously hypertensive rat. *Science.* 1972;176:1155-6.

Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med.* 2006;12(1):17-25

.

ANEXO

ANEXO A – Comitê de Ética em Experimentação Animal

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

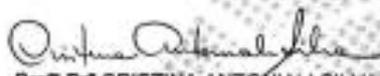


COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ATENOLOL NO PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)" sob responsabilidade da Profa Dra CRISTINA ANTONIALI SILVA e colaboração de NATÁLIA MANRIQUE CURSINO está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 29 de fevereiro de 2008, de acordo com o protocolo no. 2008-001397.

Araçatuba, 05 de março de 2008.


Profª Drª CRISTINA ANTONIALI SILVA
Presidente da CEEA - FQAUNESP

Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Estadual Paulista
Rua José Bonifácio, 1192 CEP 13015-000 Araçatuba - SP
Tel: (14) 3606-3200