



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

BÁRBARA STÉFANI SILVA DA COSTA

**Sistema RANK/RANKL/OPG no complexo hipocampal de
ratos adultos com neuroinflamação experimental induzida
por lipopolissacarídeos**

Araçatuba- SP
2023

BÁRBARA STÉFANI SILVA DA COSTA

**Sistema RANK/RANKL/OPG no complexo hipocampal de
ratos adultos com neuroinflamação experimental induzida
por lipopolissacarídeos**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Odontologia
de Araçatuba da Universidade Estadual
Paulista (Unesp), como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio A. Casatti

Araçatuba- SP
2023

Dedico este trabalho a Deus por nortear minha vida e ter me dado motivos para não desistir.

Aos meus pais Silson R da Costa e Eloisa Ap Silva da Costa, por sempre acreditarem que eu seria capaz, por todo o esforço que fizeram para me ver chegar até aqui. Nada foi em vão, e eu prometo sempre dar tudo de mim, para ser o melhor para vocês.

Ao meu irmão Olavo R Silva da Costa, por todo o amor e carinho, espero ser exemplo e orgulho para você, assim como é para mim.

Ao meu noivo Renan Inacio Rocha, por compartilhar a vida comigo, e acreditar nos meus sonhos. Sem o seu apoio, carinho e incentivo, nada seria possível.

Aos meus amigos, por estarem ao meu lado nos dias felizes e me motivando nos dias difíceis.

Em especial, dedico esse trabalho a memória da minha madrinha Aline, que sempre me incentivou, e acreditou que meu sonho seria possível, você sempre estará em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Orientador, **Prof. Dr. Cláudio A. Casatti**, por todo o ensinamento ao longo desses anos, pela paciência e o apoio sempre. Obrigada pela oportunidade.

À **Profa. Dra. Alaide Gonçalves**, por toda ajuda, apoio e conhecimento transmitido durante o projeto. Muito obrigada por aceitar fazer parte dessa banca.

À **Profa. Dra. Flavia P. Pereira Faco**, por aceitar fazer parte dessa banca e por todas as oportunidades que vem me dando, de muito aprendizado e experiência. Obrigada por acreditar no meu potencial.

Ao Prof. Dr. **Gestter Willian Lattari Tessarin**, por todo ensinamento ao longo do projeto. Desejo muito sucesso em sua vida.

Agradeço a minha dupla **Vitória Morelli Savenhago**, por ter caminhado ao meu lado todos esses anos de faculdade e projeto, por dividir as angústias e inseguranças do dia a dia, e por compartilhar os momentos bons e de aprendizado.

À minha família e amigos, que acreditaram em mim durante esta trajetória e não me deixaram desistir. Agradeço aos meus pais **Silson e Eloisa**, ao meu irmão **Olavo**, meu noivo **Renan**, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis e felizes também, toda a minha força vem de vocês. Agradeço as minhas amigas (irmãs) **Paloma, Heloize, Leticia e Monise** por todo o apoio ao longo desses anos.

Agradeço aos amigos que fiz na faculdade, que viraram minha nova família aqui em Araçatuba.

Agradeço também a pró reitoria de pesquisa da UNESP (PROPe) e ao CNPq pela bolsa de iniciação científica PIBIC concedida a mim.

"Toda pessoa deveria ser aplaudida de pé pelo menos uma vez na vida, porque todos nós vencemos o mundo."

August Pullman - Extraordinário

COSTA, B. S. S. Análise imuno-histoquímica e da expressão gênica do sistema RANK/RANKL/OPG no complexo hipocampal de ratos adultos submetidos ao modelo experimental de neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeos. 2023. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

O receptor ativador do fator nuclear κ B (RANK) e seu ligante (RANKL), assim como a osteoprotegerina (OPG) foram caracterizados na década de 90, sendo exhaustivamente estudado na área de biologia óssea. O estudo do sistema RANK/RANKL/OPG no sistema nervoso central (SNC) tem sido negligenciado devido a sua discreta expressão neste território. No presente projeto de pesquisa foi avaliado o sistema RANK/RANKL/OPG no complexo hipocampal após neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeos (LPS), que ativa significativamente as células micróglias e astrócitos reativos pró-inflamatórios. Para tal propósito, ratos adultos machos receberam injeção intraperitoneal de LPS e foram sacrificados por perfusão transcardíaca após 1, 3 e 7 dias; enquanto o grupo controle recebeu injeção de solução fisiológica. Cortes histológicos congelados frontais foram submetidos a técnica da imunoperoxidase indireta para identificar as proteínas RANK, RANKL e OPG, seguido de análise qualitativa e quantitativa em microscopia de campo claro. A imunorreatividade para essas proteínas estavam restritas principalmente nos neurônios em todo o complexo hipocampal e no giro denteado, sendo que as imunorreatividades para OPG e RANK foram mais intensas em relação a RANKL. A avaliação quantitativa não mostrou alterações significantes ($P>0.05$) na região CA3 do complexo hipocampal entre os grupos com neuroinflamação e o grupo controle. Em conclusão, o sistema RANK/RANKL/OPG não mostrou alterações induzidas pela neuroinflamação com LPS no complexo hipocampal de ratos adultos.

Palavras-chave: Hipocampal. Neuroinflamação. Lipopolissacarídeos. Osteoprotegerina.

COSTA, B. S. S. Immunohistochemical and genic expression analysis of the RANK/RANKL/OPG system in the hippocampal complex in adult rats submitted to neuroinflammation induced by lipopolysacharide. 2023. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

The receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) and its ligand (RANKL), as well as osteoprotegerin (OPG) were characterized in the 90s and have been extensively studied in bone tissue biology. The study of the RANK/RANKL/OPG system in the central nervous system (CNS) has been neglected due to its discreet expression in this territory. In the present study, the RANK/RANKL/OPG system was evaluated in the hippocampal complex after neuroinflammation induced by lipopolysaccharides (LPS), which significantly activates microglial cells and pro-inflammatory reactive astrocytes. For this purpose, adult male rats received an intraperitoneal injection of LPS and were sacrificed by transcardiac perfusion after 1, 3 and 7 days, while the control group received an injection of saline solution. Frontal frozen histological sections were submitted to the indirect immunoperoxidase technique to identify RANK, RANKL and OPG proteins, followed by qualitative and quantitative analysis in light microscopy. The immunoreactivity for these proteins was mainly restricted to neurons throughout the hippocampal complex and the dentate gyrus, with the immunoreactivity for OPG and RANK being more intense in relation to RANKL. The quantitative evaluation showed no significant changes ($P>0.05$) in the CA3 region of the hippocampal complex between the groups with neuroinflammation and the control group. In conclusion, the RANK/RANKL/OPG system not showed changes induced by neuroinflammation with LPS in the hippocampal complex of adult rats.

Keywords: Hippocampal. Neuroinflammation. Osteoprotegrin. Lipopolysaccharide.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados absolutos das porcentagens da densidade de imunorreatividade para OPG nos diferentes grupos experimentais	28
Tabela 2 - Dados absolutos das porcentagens da densidade de imunorreatividade para RANK nos diferentes grupos experimentais	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema mostrando o complexo hipocampal, com suas subdivisões e camadas celulares, baseado em suas características citoarquitetônicas. Abreviaturas: CA, subdivisão ou subcampo do Cornu de Ammonis; DG, giro denteado; F, fimbria; H, hilus; SO, estrato oriens; SP, estrato piramidal; SR, estrato radiato; SLM, estrato lacunoso-molecular; SL, estrato lúcido; SM, estrato molecular; SG, estrato granuloso

23

Figura 2 - Fotomicrografia em microscopia de campo claro mostrando corte histológico frontal do hipocampo de rato adulto sacrificado 3 dias, após a administração de lipopolissacarídeo (LPS, 5mg/kg de peso corporal), submetido a técnica da imunoperoxidase indireta empregando ao anticorpo anti-osteoprotegerina (OPG). Observar em A, as diferentes partes do hipocampo, destacada nas demais fotomicrografias (B-B', CA1; C-C', CA2; D-D', CA3; E-E', giro denteado - GD). A região CA2 mostrou a menor presença de neurônios imunorreativos (C-C'). As células predominantes que exibem imunorreatividade a OPG são neurônios. Abreviaturas: CA, subdivisão ou subcampo do Cornu de Ammonis do complexo hipocampal; DG, giro denteado

25

Figura 3 - Fotomicrografia em microscopia de campo claro mostrando corte histológico frontal do hipocampo de rato adulto, sacrificado 3 dias após a administração de lipopolissacarídeo (LPS, 5mg/kg de peso corporal), submetido a técnica da imunoperoxidase indireta empregando ao anticorpo anti- receptor ativador do fator nuclear κ B (RANK). Observar em A, as diferentes partes do hipocampo, destacada nas demais fotomicrografias (B-B', CA1; C-C', CA2; D-D', CA3; E-E', giro denteado - GD). A região CA2 mostrou a menor presença de neurônios imunorreativos (C-C'). As células predominantes que exibem imunorreatividade a RANK também são neurônios. Abreviaturas: CA, subdivisão ou subcampo do Cornu de Ammonis do complexo hipocampal; DG, giro denteado

26

Figura 4 - Fotomicrografias em microscopia de campo claro mostrando cortes histológicos frontal do hipocampo (região CA3) de ratos adultos do grupo controle (A-A'), grupo 1 dia (LPS/ 1 dia, B-B''), grupo 3 dias (LPS/ 3 dias, C-C'') e grupo 7 dias (LPS/ 7 dias, D-D''), após a indução da neuroinflamação por LPS (LPS, 5mg/kg de peso corporal), submetidos a técnica da imunoperoxidase indireta empregando os anticorpo anti-OPG (A-D), RANK (A'-D') e RANKL (A''-D''). Observar uma tendência

dos animais do grupo LPS/ 3 dias exibirem uma maior densidade de neurônios imunorreativos, principalmente para as proteínas OPG e RANK. A imunorreatividade da RANKL é discreta, não permitindo observar neurônios ou células gliais exibindo características típicas de imunopositividade

27

Figura 5 - Dados absolutos da porcentagem da densidade de imunorreatividade para OPG e RANK na subregião CA3 do complexo hipocampal de ratos adultos dos grupos controle, LPS/ 1 dia, LPS/ 3 dias, LPS/ 7 dias. Os dados absolutos foram submetidos a análise de variância e pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni, considerando $p < 0.05$ como significante

29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CA	Cornu de Ammonis do complexo hipocampal
CA1	Subregião ou subcampo 1 do Cornu Ammonis do complexo hipocampal
CA2	Subregião ou subcampo 2 do Cornu Ammonis do complexo hipocampal
CA3	Subregião ou subcampo 3 do Cornu Ammonis do complexo hipocampal
CA4	Subregião ou subcampo 4 do Cornu Ammonis do complexo hipocampal
CFS	Líquido cefalorraquidiano
CONTR	Grupo controle
CSF	Líquido cefalorraquidiano
DG	Giro Denteado
EPM	Erro padrão médio
F	Fimbria
H	Hilus
ICV	Intracerebroventricular
IHQ	Imuno-histoquímica
LPS	Lipopolissacarídeos
MCAO	Modelo para oclusão da artéria cerebral média
MS	Esclerose múltipla
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Tampão fosfato
RANK	Receptor ativador do fator nuclear κ B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B
SG	Estrato Granuloso
SL	Estrato Lúcido
SLM	Estrato Lacunoso-molecular
SM	Estrato Molecular
SNC	Sistema nervoso central
SO	Estrato Oriens
SP	Estrato Piramidal
SR	Estrato Radiato
TNF	Receptor do fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Animais.....	19
3.2 Neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeos (LPS)	19
3.3 Perfusão transcardíaca	19
3.4 Imunoperoxidase indireta para identificação da imunorreatividade para RANK, RANKL e OPG	20
3.5 Análises qualitativas e quantitativas.....	22
4 RESULTADOS	24
4.1 Análise qualitativa	24
4.2 Análise qualitativa	27
5 DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35
ANEXOS	39

1 INTRODUÇÃO

O Receptor Ativador do Fator Nuclear κ B (RANK), seu Ligante (RANKL) e a Osteoprotegerina (OPG) foram caracterizados na década de 90 e desempenham papéis cruciais no desenvolvimento dos tecidos e órgãos do sistema imunológico. Eles são particularmente estudados na área da biologia óssea (ONO *et al.*, 2020). A proteína RANKL interage com o receptor RANK, promovendo a osteoclastogênese, estimulando a atividade osteoclástica e prolongando a vida útil dos osteoclastos ativos (ONO *et al.*, 2020). Por outro lado, a OPG pode se ligar ao RANKL, agindo assim como um regulador negativo da reabsorção óssea (ONO *et al.*, 2020).

O RANK é uma proteína transmembrana do tipo I, composta por 616 aminoácidos, que é codificada pelo gene RANK (TNFRSF11A) localizado no cromossomo 18 (18q21.33) (LIU; ZHANG, 2015; ONO *et al.*, 2020). Esta proteína faz parte da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) e é expressa principalmente em precursores de osteoclastos, osteoclastos maduros, células dendríticas, macrófagos e micróglia (ONO *et al.*, 2020). O RANKL é uma glicoproteína transmembrana do tipo II, composta por 317 aminoácidos, que é codificada pelo gene RANKL (TNFSF11) localizado no cromossomo 13 (13q14.11). Também faz parte da superfamília do TNF (LIU; ZHANG, 2015; ONO *et al.*, 2020). O domínio extracelular do RANKL é clivado por metaloproteinases, resultando em uma proteína solúvel que interage com o RANK. O RANKL é principalmente expresso em osteoblastos e osteócitos (LIU; ZHANG, 2015; ONO *et al.*, 2020). A OPG é uma proteína composta por 401 aminoácidos, derivada da transcrição do gene OPG (TNFRSF11B) localizado no cromossomo 8 (8q24.12) (LIU; ZHANG, 2015; ONO *et al.*, 2020). Ela é principalmente expressa em osteoblastos, células epiteliais do trato gastrointestinal, pulmões, glândula mamária, células dendríticas e linfócitos B (LIU; ZHANG, 2015; ONO *et al.*, 2020). Essa proteína também pertence à superfamília de receptores de TNF e é secretada como uma proteína solúvel, atuando como um "receptor falso" (decoy receptor) para o RANKL.

O estudo do sistema RANK/RANKL/OPG no sistema nervoso central (SNC) tem sido subestimado devido à sua expressão discreta sob condições normais ou durante patologias (HANADA *et al.*, 2009). No entanto, alguns estudos pontuais indicam um possível envolvimento direto ou indireto desse sistema em processos

neuroinflamatórios, neurodegenerativos e neurotumoriais. Os primeiros indícios da atividade do sistema RANK/RANKL/OPG no SNC surgiram a partir de pesquisas que demonstraram um aumento significativo dos níveis de OPG no plasma sanguíneo de pacientes com isquemia cerebral aguda, o que se revelou um indicador desfavorável para a evolução do quadro clínico (JENSEN *et al.*, 2010; SONG *et al.*, 2012; ÜSTÜNDAĞ *et al.*, 2011). Posteriormente, um estudo empregando o modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAO) em camundongos "knock-out" para o gene OPG (OPG^{-/-}) revelou que a interação RANK-RANKL reduziu significativamente a inflamação tecidual decorrente do quadro isquêmico, associando-se a desfechos clínicos favoráveis (SHIMAMURA *et al.*, 2014). Os animais OPG^{-/-} ou que receberam a administração intracerebroventricular (ICV) de RANKL apresentaram menor expressão de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 β), fator alfa de necrose tumoral (TNF α), óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e proteína 1 quimiotática de monócitos (MCP-1) (SHIMAMURA *et al.*, 2014). Além disso, esse estudo revelou a presença de RANK em macrófagos migrantes em animais controle com indução de isquemia cerebral, enquanto RANKL e OPG foram observados na micróglia (SHIMAMURA *et al.*, 2014). Vale ressaltar que esse sistema proteico estava ausente no córtex cerebral de animais sem lesão isquêmica (SHIMAMURA *et al.*, 2014).

Em camundongos neonatais submetidos à hipóxia, observou-se um aumento na expressão de OPG, como relatado por Kichev *et al.* em 2014. Além disso, a OPG também apresentou níveis elevados em culturas primárias de neurônios e oligodendrócitos quando tratados com TNF α / IFN γ , conforme constatado no mesmo estudo (KICHEV *et al.*, 2014). Pesquisas posteriores desse mesmo grupo revelaram importantes descobertas relacionadas ao sistema RANK/RANKL/OPG. Eles destacaram que a linhagem de micróglia BV2 sofreu significativas modificações nesse sistema, bem como em outras substâncias imunomoduladoras, em resposta a estímulos neuroinflamatórios (KICHEV *et al.*, 2017).

É interessante destacar que a migração de linfócitos T para o SNC, seja atravessando a barreira hematoencefálica ou o líquido cefalorraquidiano (CSF), depende da interação entre o RANKL expresso na superfície dos linfócitos T e seu receptor RANK, presente nos astrócitos, como demonstrado por Guerrini *et al.* (2015).

Essa interação estimula os astrócitos a sintetizarem e liberarem a quimiocina Ccl20 (Ligante 20 de CC quimiocina), que, por sua vez, interage com o receptor CCR6 (Receptor de quimiocina tipo CC 6) na superfície dos linfócitos TH17, promovendo assim sua migração para o SNC. É bem estabelecido que os astrócitos desempenham um papel fundamental na manutenção da permeabilidade vascular no SNC, por meio de suas projeções conhecidas como "pés vasculares". Além disso, eles constituem uma barreira na superfície do SNC, chamada de "glia limitante", que desempenha um papel crucial no tráfego bidirecional de substâncias e células entre o sangue circulante e o líquido cefalorraquidiano (CSF) com o tecido nervoso. Esta interação entre RANKL dos linfócitos T com RANK dos astrócitos pode ser um fator chave que facilita o desenvolvimento de encefalites autoimunes, podendo ser um dos alvos para o tratamento adjuvante de distúrbios neuroimunológicos (GUERRINI *et al.*, 2015).

Recentemente, em virtude da pandemia do SARS-CoV-2, alguns estudos apontam as células astrocitárias e micróglia como células-chaves na patologia da encefalite induzida por esta classe de vírus (LAVI; CONG, 2020). Estes autores demonstraram que a infecção do vírus MHV-A59 ("mouse hepatitis viroses" A59) em linhagens de micróglia e astrócitos, resultou em aumento de inúmeras citocinas inflamatórias (IL1 α , IL1 β , IL7, IL13, IL15, IL16, IL17, IL17 β , IL18, IFN α , IFN β , IFN γ e TNF), principalmente em astrócitos tipo I, que são pró-inflamatórios (LAVI; CONG, 2020). O MHV-A59, pertencente ao gênero dos coronavírus, possui a capacidade de infectar animais por meio das vias nasais, resultando em condições como hepatite, meningite, encefalite e desmielinização. Essa infecção apresenta características clínicas e histopatológicas semelhantes às induzidas pelo SARS-CoV-2, conforme relatado por Das Sarma *et al.* (2001) e Li *et al.* (2004). É notável que a proteína de membrana conhecida como enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2, "angiotensin-converting enzyme 2"), que desempenha um papel fundamental na entrada do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras, está presente em várias células do SNC de humanos e roedores. Essas células incluem neurônios, astrócitos, micróglia, entre outras, como relatados em estudos e revisões anteriores (BATTAGELLO *et al.*, 2020; CHOI *et al.*, 2020; GOWRISANKAR; CLARK, 2016; STEARDO *et al.*, 2020; XIA; LAZARTIGUES, 2010). Esses estudos destacam a semelhança entre as infecções induzidas pelo MHV-A59 e pelo SARS-CoV-2, bem como a presença da proteína

ACE2 em células do SNC, evidenciando a importância dessa proteína no contexto de infecções virais e suas implicações potenciais na patologia neurológica. A expressão da ACE2 demonstrou um aumento significativo em animais submetidos à isquemia cerebral induzida pela oclusão da artéria cerebral média (MCAO), sugerindo que pacientes com lesões vasculares no SNC podem estar mais suscetíveis a encefalites induzidas pelo SARS-CoV-2, conforme indicado por Choi *et al.* (2020).

Um estudo recente demonstrou que a ativação neuronal durante injúria cerebral traumática (traumatic brain injury, TBI) induz um significativo aumento da sinalização de cálcio nuclear nos neurônios, que por sua vez ativam diversos sistemas neuronais que levam a secreção de neuromediadores que permitem modular as células da glia (FRÖHLICH *et al.*, 2022). Nesse ponto, esses autores mostraram que a diminuição da disponibilidade de cálcio intranuclear em neurônios na área de TBI induziu na acumulação e ativação da micróglia, diminuição das conexões sinápticas locais e diminuição da expressão de OPG (FRÖHLICH *et al.*, 2022). Esse mecanismo foi também evidenciado em animais com indução de baixa sinalização de cálcio intranuclear, sendo revertido esses efeitos após a indução da expressão de OPG nesses animais. Isto posto, os autores concluem que a migração e ativação da micróglia, bem como a preservação das sinapses no córtex cerebral de animais com TBI são dependentes da sinalização do cálcio intranuclear nos neurônios, assim como dependente da OPG neuronal (FRÖHLICH *et al.*, 2022). Essa evidência também foi comprovado quanto o aumento da presença de OPG no líquido cefalorraquidiano coletado de pacientes logo após o TBI, retornando aos níveis basais após 3 dias (FRÖHLICH *et al.*, 2022).

Outros estudos também têm fornecido evidências de alterações no sistema RANK/RANKL/OPG em pacientes na fase inicial da esclerose múltipla (MS), quando comparados a indivíduos saudáveis, como demonstrado por Glasnović *et al.* (2018). Essas proteínas foram avaliadas tanto no líquido cefalorraquidiano (CSF) quanto no plasma sanguíneo, revelando uma redução nos níveis de OPG no CSF de pacientes com MS. Além disso, a relação entre RANKL e OPG mostrou-se mais elevada no CSF de pacientes com MS e no plasma de pacientes durante os períodos de remissão dos sintomas da doença. Por fim, a expressão gênica dessas proteínas demonstrou um aumento significativo nas células sanguíneas mononucleadas de pacientes durante os períodos de remissão dos sintomas da MS (GLASNOVIĆ *et al.*, 2018).

Além de processos neuroinflamatórios, a proteína RANKL também tem sido correlacionado com o processo de ingestão alimentar (LEE *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2018). Desse modo, tem sido observado que RANKL induz diminuição no comportamento ingestivo, reduzindo o peso corporal através da modulação dos neurônios expressando neuropeptídeo Y (NPY) e pelo transcrito regulado pela anfetamina e cocaína (“cocaine-amphetamine-regulated transcript”, CART). RANKL/RANK também é potencialmente capaz de ativar a área septal lateral, induzido aumento da temperatura corporal através da ciclooxigenase ou prostaglandina E2 dependente da fosfolipase 2 que agem no receptor E3 da prostaglandina em astrócitos do hipotálamo induzindo a hipertemia (HANADA *et al.*, 2009). Injeção intracerebroventricular de RANKL no ventrículo lateral também induz hipertemia (HANADA *et al.*, 2009).

O sistema RANK/RANKL/OPG tem sido objeto de estudos relacionando ao uso de inibidores da reabsorção óssea como tratamento coadjuvante para diversos tipos de tumores neurais, além daqueles para os quais essas drogas já são utilizadas, como osteossarcomas e mielomas, como relatado por Drake, Clarke e Khosla (2008) e Peters *et al.* (2019). Um estudo anterior revelou um aumento significativo na metilação do gene RANK em pacientes com glioblastomas ou astrocitomas, bem como em linhagens celulares de glioblastomas (VON DEM KNESEBECK *et al.*, 2012). É importante ressaltar que o aumento da metilação do gene tende a inibir sua transcrição. Esses mesmos autores também demonstraram que experimentos com linhagens celulares de glioblastomas tratadas com agentes desmetilantes resultaram em um aumento na expressão do gene RANK (VON DEM KNESEBECK *et al.*, 2012). O aumento da expressão de RANK teve um efeito positivo na ativação de várias vias de sinalização celular, incluindo NF- κ B, JNK, ERK, p38 α e Akt/PKB, resultando na indução da apoptose e na redução de aglomerados dessas células tumorais em ensaios *in vitro* (VON DEM KNESEBECK *et al.*, 2012). Esses resultados sugerem que a manipulação do sistema RANK/RANKL/OPG pode desempenhar um papel significativo como terapia coadjuvante em glioblastomas e astrocitomas, que frequentemente têm respostas pouco favoráveis aos tratamentos quimioterápicos disponíveis e com mortalidade elevada em um curto período após o diagnóstico.

Astrócitos e células micróglia desempenham um papel fundamental na manutenção das condições fisiológicas do ambiente extracelular do SNC. Além disso,

essas células também são responsáveis pela eliminação e refinamento das conexões sinápticas, como destacado por diversos estudos (CARSON et al., 2006; COLONNA; BUKOVSKY, 2017; HARADA; KAMIYA; TSUBOI, 2016; SOFRONIEW, 2020; SOFRONIEW; VINTERS, 2010; VAINCHTEIN; MOLOFSKY, 2020). A interação entre micróglia e astrócitos desempenha um papel crucial nos processos de defesa e reparo do tecido nervoso durante eventos traumáticos, inflamatórios, infecciosos, neurodegenerativos e tumorais, como demonstrado por estudos anteriores (COLONNA; BUKOVSKY, 2017; SOFRONIEW, 2020; SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

A correlação entre o sistema RANK/RANKL/OPG e lesões teciduais no SNC tem sido pouco explorada até o momento. Um estudo piloto conduzido em nosso laboratório revelou um aumento na imunomarcagem para RANK, RANKL e OPG no complexo hipocampal, possivelmente em células micróglia e, principalmente, em astrócitos reativos do tipo II, que são conhecidos por terem propriedades neuroprotetoras. Isso ocorreu em ratos adultos submetidos à indução experimental de epilepsia por meio do modelo que envolve o uso de cloreto de lítio e cloridrato de pilocarpina. Nesse modelo de insulto tecidual, observa-se uma intensa e persistente apoptose neuronal no complexo hipocampal devido à ativação prolongada das células neuronais e à excitotoxicidade. Assim, a avaliação do sistema RANK/RANKL/OPG em um modelo diferente de lesão tecidual, especialmente aquele induzido pela neuroinflamação provocada pelo lipopolissacarídeo (LPS), que inicialmente ativa as células micróglia e os astrócitos do tipo A1 (pró-inflamatórios), seria de grande interesse. Isso poderia contribuir para a confirmação dos dados recentes na literatura que sugerem a participação desse sistema proteico em processos de neuroinflamação.

2 OBJETIVO

O presente estudo analisou a densidade de imunorreatividade das proteínas RANK, RANKL e OPG no complexo hipocampal de ratos adultos, após a indução experimental de neuroinflamação por lipopolissacarídeos (LPS).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para atender ao objetivo proposto neste estudo, utilizamos um total de 20 ratos adultos jovens (aproximadamente 60 dias de idade) da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com um peso corporal médio de cerca de 200g. Esses animais foram obtidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA – UNESP).

Durante todo o experimento, os ratos foram mantidos em gaiolas individuais sob condições de ciclo claro-escuro de 12 horas, em uma temperatura ambiente de 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Eles tinham acesso ilimitado à água e ração. Os animais foram divididos em dois grupos distintos: um grupo submetido à indução de neuroinflamação e um grupo controle. É importante destacar que este estudo experimental recebeu aprovação prévia da comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (número de processo 652/2023).

3.2 Neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeos (LPS)

Para induzir experimentalmente a neuroinflamação com LPS (lipopolissacarídeo), os animais receberam uma dose de 5 mg/kg de LPS derivado da *Escherichia coli* (O55:B5, Sigma St. Louis, MO, USA), que foi previamente diluído em solução fisiológica. A administração foi realizada por via intraperitoneal, conforme descrito por Fu *et al.* (2014) e Fan *et al.* (2014). Após intervalos de 24 horas, 72 horas e 7 dias a partir da administração do LPS, os animais foram submetidos a perfusão transcardíaca para realizar a técnica de imuno-histoquímica (IHQ), com um total de 5 animais em cada grupo de neuroinflamação e 5 animais no grupo controle. É importante mencionar que os animais do grupo controle receberam o mesmo volume da solução veículo, sem a adição de LPS.

3.3 Perfusão transcardíaca

Os animais foram inicialmente anestesiados com uma solução de cloridrato de cetamina (70 mg/kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg, Rompum®, Bayer, RS, Brazil). Em seguida, foram submetidos ao processo de

perfusão transcardíaca inicialmente com solução salina heparinizada (150 ml), seguido de solução fixadora de formaldeído a 4% (Sigma-Aldrich, MO, USA) em tampão fosfato (PBS) 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, os encéfalos foram removidos, pós-fixados por 12 horas. Os encéfalos foram divididos em dois blocos (anterior mantendo as estruturas anatômicas rostral ao hipocampo e posterior contendo o hipocampo até a região pontina), transferidos para cassete histológico e mantidos em sacarose a 30% durante 10 dias a 4°C, para minimizar a retração decorrente do posterior processamento de inclusão em parafina. Após esse período, as amostras foram submetidas a um banho de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4 durante 2 horas sob suave agitação e seguiram o processo de desidratação, diafanização e impregnação (álcool 70°, álcool 80°, álcool 90°, álcool 95°, álcool 100°-1, álcool 100°-2, álcool 100°/xilol, xilol 1, xilol 2, xilol 3, parafina histosec 1, parafina histosec 2) durante 1 hora em cada banho a temperatura ambiente em um processador automático de tecido (PT500, Lupetec, SP, Brasil). Em prosseguimento, foram transferidos para um terceiro banho de parafina (parafina histosec 3) em estufa com controle microprocessado (59°C, Fanem, SP, Brasil) e incluídos em moldes adequados. Os blocos de parafina devidamente identificados foram trimados em micrótomo (Leica) até a região do hipocampo (coordenadas) ser alcançada, quando, então, foram coletados cortes histológicos no plano coronal do encéfalo com 5 µm de espessura que foram coletados em uma sequência de 25 lâminas imunoslides (Knittel, Alemanha). Em cada lâmina histológica foram coletados 1 corte de cada animal pertencente ao mesmo grupo animal. Exemplificando, em uma determinada lâmina tinha um corte histológico ao nível do hipocampo de cada animal de cada grupo experimental; portanto, cada lâmina histológica tinha 5 cortes histológicos, um de cada animal. Foram preparadas uma série de 25 lâminas dos animais de cada grupo experimental. Essas lâminas histológicas foram desidratadas a temperatura ambiente durante 24 horas e transferidas para uma estufa em com controle microprocessado (59°C) durante 48 horas. As lâminas histológicas foram estocadas em caixas porta-lâminas de plástico para posterior processamento imuno-histoquímico.

3.4 Imunoperoxidase indireta para identificação da imunorreatividade para RANK, RANKL e OPG

Com o intuito de análise qualitativa do padrão de imunomarcção destas proteínas, duas lâminas (lâmina #1 e lâmina #12, equidistantes 55 µm) foram

selecionadas; enquanto para análise quantitativa, 3 lâminas (lâminas #2, lâmina #13 e lâmina #24, equidistantes 55 μ m) contendo cortes histológicos de cada grupo experimental (de uma série de 25 lâminas de cortes histológicos que incluem o complexo hipocampal) foram selecionadas para cada proteína (RANK, RANKL ou OPG). Inicialmente, as lâminas histológicas foram submetidas a uma sequência de banhos em xilol I-III, durante cinco minutos cada passagem, desidratação empregando álcool 100% por dois minutos, álcool 95% por dois minutos e álcool 70% por dois minutos. Em prosseguimento, foram realizadas três lavagens em PBS (0,1M, pH 7,4), PBS/Triton (PBS 0,1 M acrescido de 0,03% de triton X-100), seguido por PBS 0,1M, durante cinco minutos cada passagem e recuperação antigênica, onde as lâminas foram tratadas em calor úmido em câmara pressurizada (Decloaking Chamber – Biocare Medical, CA, USA), empregando solução de 1% de tampão citrato (100x Citrate Buffer, pH=6,0, Spring Bioscience, CA, USA) durante 10 minutos sob pressão alta. Os recipientes com as lâminas histológicas foram retirados da câmara pressurizada e passaram por resfriamento em temperatura ambiente por um período de uma hora e trinta minutos. Seguido de lavagens em PBS-T e bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 a 0.03 % durante 1 hora, seguido da inibição de sítios inespecíficos em PBS-T (PBS + 0,001% de Triton X-100) com 5% de leite em pó desnatado e finalmente bloqueio adicional com PB-TX com 2% soro normal de burro por 24 horas a 4°C. Em prosseguimento, as lâminas histológicas foram incubadas com um dos anticorpos primários policlonais obtidos em coelho (RANK, 1:100, sc-9072; RANKL, 1:100, sc-377079, Santa Cruz Biotechnology, USA) ou monoclonal obtidos em clones de camundongos (OPG, 1:100, sc-390518, Santa Cruz Biotechnology, USA) diluídos em PB-TX com 2% soro normal de burro por 24 horas a temperatura ambiente. Os cortes histológicos foram lavados em PB-TX, submetidos a incubação durante 1 hora com o anticorpo secundário biotinilado anti-camundongo ou anti-coelho, obtidos em burro (1:800, 715-067-003, 711-065-152, Jackson Immunoresearch Laboratories Inc, USA), seguido de incubação durante 1 hora pelo complexo avidina biotina (1:200, PK-6200, Kit ABC, Vector Laboratories, CA, USA) e finalmente revelados com o substrato H_2O_2 (0.001%) e o cromógeno diaminobenzidina a 0,02%, acrescido de sulfato de cromo e níquel, sob controle em microscopia de luz. Os cortes histológicos foram exaustivamente lavados em PB, desidratados em uma sequência de álcoois, diafanizados e montados com meio de montagem DPX e lamínulas de vidro.

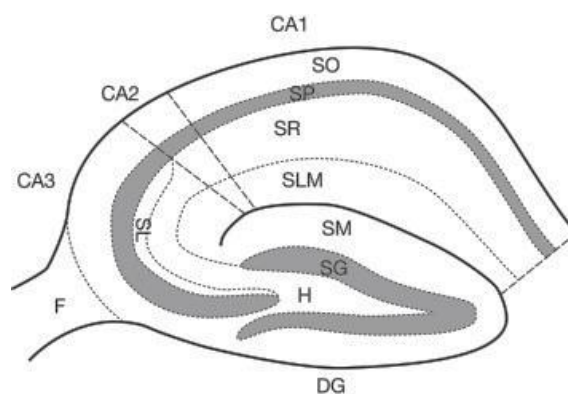
O controle imuno-histoquímico foi realizado pela omissão dos anticorpos primários empregados.

3.5 Análises qualitativas e quantitativas

As análises qualitativas das imunorreatividades para as proteínas RANK, RANKL ou OPG no complexo hipocampal foram realizadas em microscopia de luz (Axiolab A1, Carl Zeiss, BW, Alemanha), de acordo com a sua divisão citoarquitetônica (Jiang e Swann, Figura 1) e baseada no Atlas esterotáxico do SNC de ratos (SWANSON, 1992).

As análises quantitativas foram baseadas na porcentagem da densidade de imunorreatividade na subregião do CA3 do complexo hipocampal (Figura 1). Para isto, as imagens da sub-região CA3 de 3 cortes histológicos disponíveis foram coletadas usando objetivas de 10x em microscopia de luz (Axiolab A1, Carl Zeiss, BW, Alemanha) e analisadas com auxílio do programa eletrônico Image J (*National Institute of Mental Health, NIMH*). Nesse software, as imagens digitais foram transformadas em 8 bits, ajustados os parâmetros de brilho e contraste para destacar as imunorreatividades, e manualmente o padrão de imunorreatividade foi selecionado de modo a incluir apenas as estruturas exibindo imunorreatividade. Posteriormente, uma área que compreendia a região do CA3 foi selecionada e submetida a mensuração da densidade de imunorreatividade. Os dados quantitativos (média e erro padrão médio) foram coletados submetidos a análise de variância (one-way ANOVA), assim como para os pós-testes para múltiplas comparações de Bonferroni, considerando $p < 0.05$ como estatisticamente significante.

Figura 1 - Esquema mostrando o complexo hipocampal, com suas subdivisões e camadas celulares, baseado em suas características citoarquitetônicas. Abreviaturas: CA, subdivisão ou subcampo do Cornu de Ammonis; DG, giro denteado; F, fimbria; H, hilus; SO, estrato oriens; SP, estrato piramidal; SR, estrato radiato; SLM, estrato lacunoso-molecular; SL, estrato lúcido; SM, estrato molecular; SG, estrato granuloso.



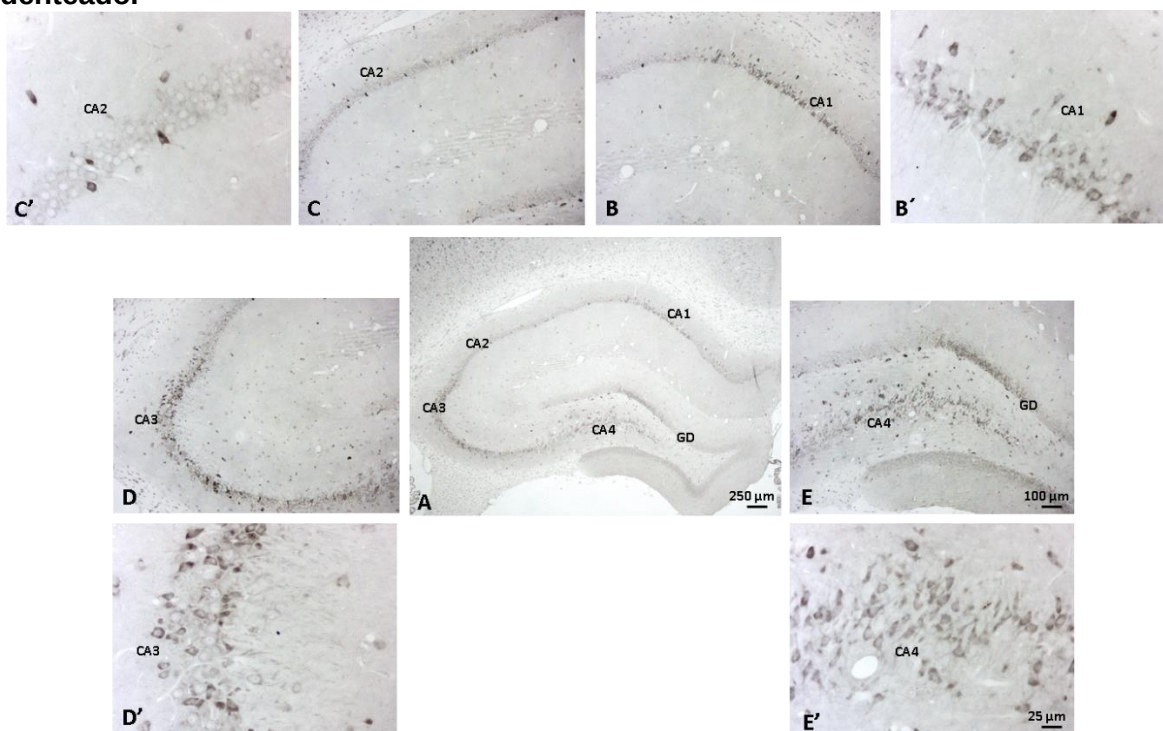
Fonte: Esquema extraído Hirofumi Noguchi, Guangnan Li, Samuel J Pleasure, (2020).

4 RESULTADOS

4.1 Análise qualitativa

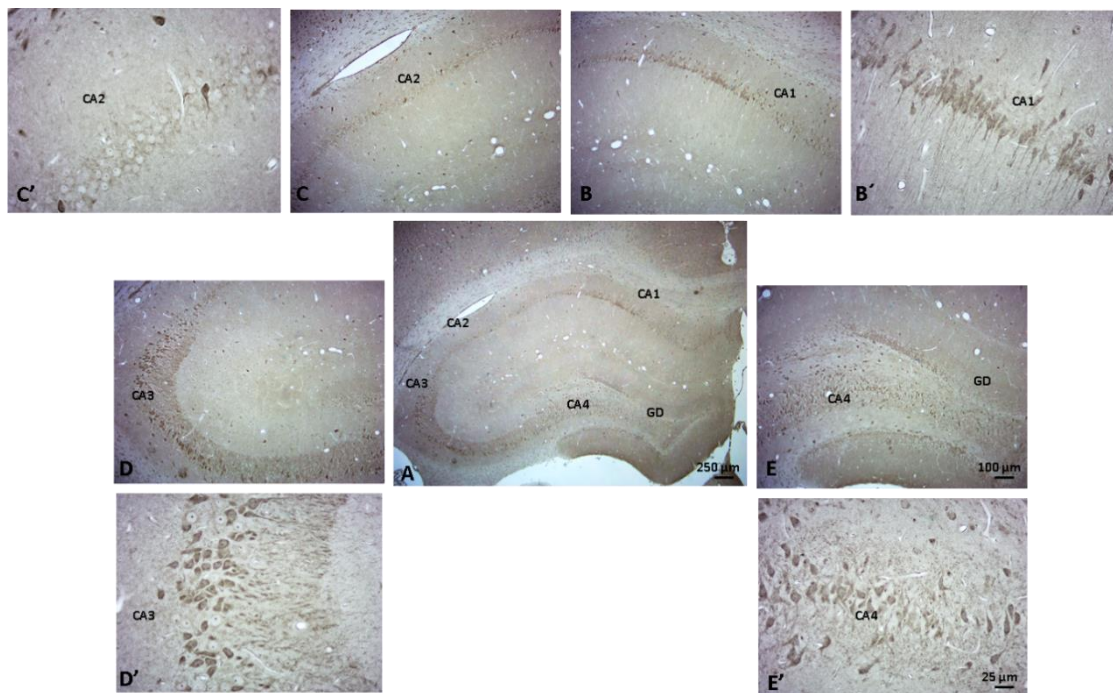
Os padrões de imunomarcações para as proteínas OPG e RANK apresentaram densidade de imunorreatividade superior quando comparado com as imunomarcações obtidas para a proteína RANKL, tornando mais fácil a identificação dos tipos celulares imunopositivos (Figuras 1 e 2). É interessante notar que o padrão de imunomarkação no complexo hipocampal não era homogêneo. As regiões CA1, CA3, CA4, a região do hilo e o giro denteado mostraram um maior número de perfis celulares de neurônios no estrato piramidal imunopositivos (Figuras 1 e 2). Os neurônios do estrato piramidal foram as principais células que apresentaram imunorreatividade (Figuras 1 e 2). No entanto, alguns perfis de corpos celulares com menor diâmetro também exibiram imunorreatividade, principalmente para a proteína OPG. Para confirmar sua natureza, será necessário realizar ensaios de dupla imunomarkação com OPG ou RANK em conjunto com marcadores específicos de astrócitos, como a proteína GFAP, em momento oportuno. A região CA3 do hipocampo foi escolhida para análises quantitativas, baseado na suas especificidades e vulnerabilidade funcional – vide discussão (Figura 3). Os cortes histológicos do hipocampo que mostraram a região CA3 dos animais do grupo experimental LPS após 3 dias de tratamento parecem exibir marcações mais consistentes para OPG e RANK em comparação com os outros grupos experimentais (controle, LPS após 1 dia e LPS após 7 dias) (Figura 3).

Figura 2 - Fotomicrografia em microscopia de campo claro mostrando corte histológico frontal do hipocampo de rato adulto sacrificado 3 dias, após a administração de lipopolissacarídeo (LPS, 5mg/kg de peso corporal), submetido a técnica da imunoperoxidase indireta empregando ao anticorpo anti-osteoprotegerina (OPG). Observar em A, as diferentes partes do hipocampo, destacada nas demais fotomicrografias (B-B', CA1; C-C', CA2; D-D', CA3; E-E', giro denteado - GD). A região CA2 mostrou a menor presença de neurônios imunorreativos (C-C'). As células predominantes que exibem imunorreatividade a OPG são neurônios. Abreviaturas: CA, subdivisão ou subcampo do Cornu de Ammonis do complexo hipocampal; DG, giro denteado.



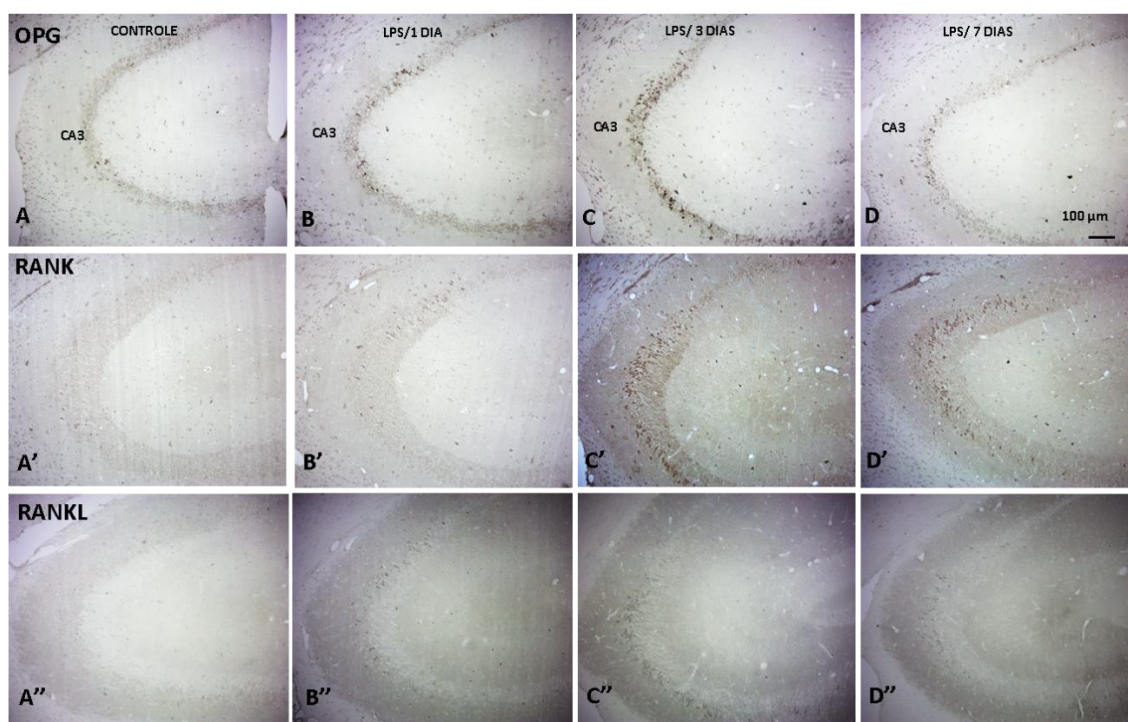
Fonte: Elaborada pelo autor (2023)

Figura 3 - Fotomicrografia em microscopia de campo claro mostrando corte histológico frontal do hipocampo de rato adulto, sacrificado 3 dias após a administração de lipopolissacarídeo (LPS, 5mg/kg de peso corporal), submetido a técnica da imunoperoxidase indireta empregando ao anticorpo anti- receptor ativador do fator nuclear κ B (RANK). Observar em A, as diferentes partes do hipocampo, destacada nas demais fotomicrografias (B-B', CA1; C-C', CA2; D-D', CA3; E-E', giro denteado - GD). A região CA2 mostrou a menor presença de neurônios imunorreativos (C-C'). As células predominantes que exibem imunorreatividade a RANK também são neurônios. Abreviaturas: CA, subdivisão ou subcampo do Cornu de Ammonis do complexo hipocampal; DG, giro denteado.



Fonte: Elaborada pelo autor (2023)

Figura 4. Fotomicrografias em microscopia de campo claro mostrando cortes histológicos frontal do hipocampo (região CA3) de ratos adultos do grupo controle (A-A''), grupo 1 dia (LPS/ 1 dia, B-B''), grupo 3 dias (LPS/ 3 dias, C-C'') e grupo 7 dias (LPS/ 7 dias, D-D''), após a indução da neuroinflamação por LPS (LPS, 5mg/kg de peso corporal), submetidos a técnica da imunoperoxidase indireta empregando os anticorpo anti-OPG (A-D), RANK (A'-D') e RANKL (A''-D''). Observar uma tendência dos animais do grupo LPS/ 3 dias exibirem uma maior densidade de neurônios imunorreativos, principalmente para as proteínas OPG e RANK. A imunorreatividade da RANKL é discreta, não permitindo observar neurônios ou células gliais exibindo características típicas de imunopositividade.



Fonte: Elaborada pelo autor (2023)

4.2 Análise qualitativa

A análise quantitativa enfocou a região CA3. A porcentagem da densidade de imunorreatividade para OPG e RANK foram discretas, raramente alcançando 5% da área total, sendo advindo principalmente das imunomarcações dos neurônios situados no estrato piramidal, como citado anteriormente (Tabelas 1 e 2). Por outro lado, a porcentagem de imunorreatividade para RANKL foi escassa, não permitindo realizar mensurações seguras, sendo descartado a coleta dos dados quantitativos. Apesar de existir uma discreta tendência em um aumento nas imunorreatividades da OPG e RANK, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os

grupos experimentais ($P>0.05$, Figura 05). **Abreviaturas: CONTR, grupo controle; LPS, lipopolisacarídeos.**

Tabela 1 - Dados absolutos das porcentagens da densidade de imunorreatividade para OPG nos diferentes grupos experimentais

	CONTR	LPS 1 DIA	LPS 3 DIAS	LPS 7 DIAS
Média	2.676	2.569	3.367	3.530
EPM	0.173	0.290	0.316	0.410
Mínimo	1.900	1.260	1.460	1.660
Máximo	3.310	3.470	4.910	5.600

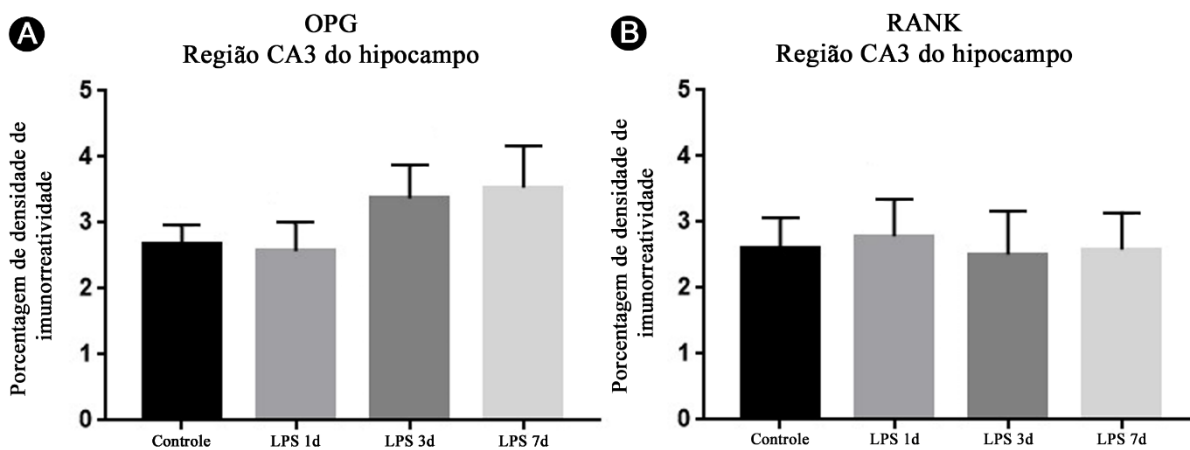
Fonte: Elaborada pelo autor (2023)

Tabela 2 - Dados absolutos das porcentagens da densidade de imunorreatividade para RANK nos diferentes grupos experimentais

	CONTR	LPS 1 DIA	LPS 3 DIAS	LPS 7 DIAS
Média	2.595	2.781	2.512	2.580
EPM	0.340	0.445	0.409	0.387
Mínimo	1.200	1.130	0.480	0.720
Máximo	3.910	4.400	4.410	4.650

Fonte: Elaborada pelo autor (2023)

Figura 5. Dados absolutos da porcentagem da densidade de imunorreatividade para OPG e RANK na subregião CA3 do complexo hipocampal de ratos adultos dos grupos controle, LPS/ 1 dia, LPS/ 3 dias, LPS/ 7 dias. Os dados absolutos foram submetidos a análise de variância e pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni, considerando $p < 0.05$ como significativo;



Fonte: Elaborada pelo autor (2023)

5 DISCUSSÃO

O presente estudo analisou o sistema RANK/RANKL/OPG no hipocampo de ratos adultos após a indução de neuroinflamação por lipopolissacarídeos (LPS). Nesse estudo foi empregado a técnica imunoperoxidase indireta para identificar qualitativamente a distribuição individual de cada proteína no complexo hipocampal, seguido de análise quantitativa (porcentagem da densidade de imunorreatividade em pixels) na sub-região CA3 do complexo hipocampal.

O modelo experimental usando LPS tem sido amplamente empregado para indução de neuroinflamação em animais de laboratório (BATISTA *et al.*, 2019; SKRZYPCZAK-WIERCIOCH; SALAT, 2022). A dose empregada de 5mk/kg de LPS permite uma intensa ativação de micróglia através dos receptores tipo Toll (“Toll-like receptors”, TLR) nas primeiras 24 horas, que liberam fator de necrose tumoral (tumor necrosis factor- α , TNF- α), interleucina-1 α , componente 1 do complemento 1 q (C1q), resultando na ativação de astrócitos que alteram a sua morfologia e tornam-se astrócitos reativos pró-inflamatórios dentro de 48 horas (SKRZYPCZAK-WIERCIOCH; SALAT, 2022). Esse processo neuroinflamatório é capaz de interferir na atividade neuronal do hipocampo, neurodegeneração e estimulando um processo de neuroplasticidade (BATISTA *et al.*, 2019; SKRZYPCZAK-WIERCIOCH; SALAT, 2022). A neuroinflamação mediada pelo LPS ativa vias de sinalização celular que são comuns na doença de Alzheimer, Parkinson entre outras, dependendo da dose, via de administração da droga e frequência de administração (BATISTA *et al.*, 2019; SKRZYPCZAK-WIERCIOCH; SALAT, 2022). Em nosso propósito, o uso de uma dose única foi para induzir um processo neuroinflamatório agudo em até 24 horas, que evolui para um processo neuroinflamatório intermediário, seguido das características da fase crônico em até 7 dias; sendo assim, permitindo avaliar uma possível alteração do sistema RANK/RANKL/OPG nessas fases da neuroinflamação.

Os resultados imuno-histoquímicos mostraram a presença constitutiva dessas proteínas, principalmente RANK e OPG, em neurônios na camada piramidal nos animais do grupo controle, assim como nos animais dos grupos com neuroinflamação. A expressão do sistema RANK/RANKL/OPG no complexo hipocampal indica que esse sistema proteico está intimamente relacionado as funções implicadas nessa importante região cerebral. O complexo hipocampal desempenha um papel crucial na

cognição, memória, processamento emocional, e distúrbios nessa região estão associados a várias condições neurológicas e psiquiátricas.

Poucos estudos enfocaram o sistema RANK/RANKL/OPG no SNC (GLASNOVIĆ *et al.*, 2020; NAGY; PENNINGER, 2015). Estudos específicos empregando anticorpos para analisar tipos celulares e quais sub-regiões do complexo hipocampal exibem imunorreatividade para RANK/RANKL/OPG são ausentes. Isto dificultou a comparação e validação dos nossos resultados imuno-histoquímicos com estudos prévios. É importante que estudos imuno-histoquímicos empregando anticorpos de diferentes fabricantes e com diferentes especificidades possam ser comparados. As imunomarcações sem significantes discrepâncias entre vários estudos permitem embasar os dados obtidos, confirmando as especificidades das imuno-marcações nos diferentes tecidos e órgãos. Não obstante, a comparação das imunomarcações do sistema RANK/RANKL/OPG no presente estudo com a base de dados públicos referente a distribuição das proteínas e a expressão de seus RNAs, denominado Atlas de proteínas humanas ("The human protein atlas", <https://www.proteinatlas.org/>), permitiu a validação dos resultados obtidos. Sendo assim, observamos que a expressão dos RNA mensageiros para OPG e RANKL no complexo hipocampal de roedores é evidente, enquanto a RANK é praticamente ausente ("The human protein atlas", <https://www.proteinatlas.org/>). Por outro lado, também pudemos confirmar a presença de OPG e RANKL e suas variantes no SNC de humanos e/ou roedores nos estudos que inicialmente isolaram e clonaram essas proteínas em mamíferos, contudo, esses estudos não especificam qual parte do SNC essas proteínas estavam presentes (PAPANASTASIOU; SIRINIAN; KALOFONOS, 2012; SIMONET *et al.*, 1997). Em condições de normalidade, as possíveis funções do sistema RANK/RANKL/OPG no SNC ainda são desconhecidas.

A análise qualitativa também revelou imunorreatividade variável principalmente, das proteínas OPG e RANK em diferentes sub-regiões do hipocampo, com os neurônios piramidais sendo as principais células imunorreativas nas regiões CA1, CA3 e CA4 e no giro denteado em todos os grupos experimentais. É sabido que as subdivisões do complexo hipocampal apresentam diferentes aspectos citoarquitetônicos e de conectividade neuronal. Portanto, essas diferenças regionais da imunorreatividade da OPG e RANK podem ser decorrentes das particularidades de cada subdivisão. É interessante destacar que a região CA2 mostrou a menor

presença de neurônios no estrato piramidal imunorreativos a OPG e RANK. Isso pode sugerir uma maior vulnerabilidade dessa região a eventos inflamatórios agudos, ou que pode ter implicações para as funções específicas associadas ao CA2.

A região CA3 do hipocampo foi selecionada para as análises quantitativas, uma vez que se trata da área hipocampal mais sensível as alterações neuroplásticas induzidas durante processos neuroinflamatórios, neurodegenerativos, sendo também o principal sítio epileptogênico (CHERUBINI; MILLES, 2015). A sub-região CA3 é também considerada a principal área indutora de ritmos de atividade elétrica neuronal importantes para função do complexo hipocampal, similar a um marco passo neuronal que dita ritmos de descargas de neurônios de outras subdivisões hipocampais e extrahipocampais (KESNER, 2007). As principais funções atribuídas a subdivisão CA3 são o processamento da informação espacial na memória a curto prazo, codificações de informações espaciais complexas, processamento de informação sequencial e processamento da geometria ambiental (KESNER, 2007).

Com relação aos grupos com neuroinflamação, a distribuição das células imunorreativas a OPG, RANK na região CA3 não mostraram alterações estatisticamente significantes quando comparados com o grupo controle. Apenas foi notada uma tendência no aumento da imunorreatividade da OPG nos animais do grupo de neuroinflamação com 3 e 7 dias. Esses dados podem indicar, que essas proteínas são estáveis e estão presentes em neurônios resistentes a degeneração induzida pelo modelo do LPS adotado no presente estudo. Não há estudos prévios empregando métodos imuno-histoquímicos indicando alterações desse sistema proteico em neurônios em modelos de neuroinflamação, isquemia cerebral, traumas cerebrais mecânicos ou mesmo em outras desordens neuropatológicas. Os estudos morfológicos disponíveis apontam a imunorreatividade de RANK em macrófagos migrantes, enquanto as imunorreatividades da RANKL e OPG foram observados em células micróglia em um modelo de isquemia cerebral (SHIMAMURA *et al.*, 2014). Além disso, essas imunomarcações estava ausente no córtex cerebral de animais sem lesão isquêmica (SHIMAMURA *et al.*, 2014).

Para uma compreensão mais completa e precisa, análises quantitativas adicionais, como exemplo, aumento do número de animais por grupo experimental poderiam permitir visualizar possíveis alterações estatisticamente significantes. Mesmo assim, essas descobertas são interessantes e indicam que a expressão das

proteínas do sistema RANK/RANKL/OPG no hipocampo são constitutivas e devem colaborar para a homeostase neuronal e a preservação das conexões sinápticas frente a processos inflamatórios nocivos. No entanto, é importante destacar que este estudo é preliminar e baseado em análises imuno-histoquímicas, sendo necessários estudos da expressão gênica que poderiam corroborar com os dados advindos desse estudo.

Em resumo, este estudo fornece uma base interessante para futuras pesquisas sobre a interação entre o sistema RANK/RANKL/OPG e a neuroinflamação no hipocampo. Com uma análise mais aprofundada e funcional desses mecanismos, podemos obter uma compreensão mais completa de como a inflamação afeta a função cerebral e desenvolver estratégias terapêuticas direcionadas para condições neurológicas relacionadas à neuroinflamação.

6 CONCLUSÃO

Dentro dos limites desse estudo, foi mostrado através de métodos imuno-histoquímicos que o sistema RANK/RANKL/OPG está presente em neurônios do complexo hipocampal de ratos adultos e que a neuroinflamação induzida pelo uso de LPS não alterou o padrão de imunorreatividade dessas proteínas.

REFERÊNCIAS

- Batista CRA, Gomes GF, Candelario-Jalil E, Fiebich BL, de Oliveira ACP. Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation as a bridge to understand neurodegeneration. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9):2293.
- Battagello DS, Dragunas G, Klein MO, Ayub ALP, Velloso FJ, Correa RG. Unpuzzling COVID-19: tissue-related signaling pathways associated with SARS-CoV-2 infection and transmission. *Clin Sci*. 2020 Aug;134(16):2137-60.
- Carson MJ, Thrash JC, Walter B. The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. *Clin Neurosci Res*. 2006;6(5):237-245.
- Cherubini E, Miles R. The CA3 region of the hippocampus: how is it? What is it for? How does it do it? *Front Cell Neurosci*. 2015;9:19.
- Choi JY, Lee HK, Park JH, Cho SJ, Kwon M, Jo C, et al. Altered COVID-19 receptor ACE2 expression in a higher risk group for cerebrovascular disease and ischemic stroke. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;528(3):413-9.
- Colonna M, Butovsky O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annu Rev Immunol*. 2017 Apr 26;35:441-68.
- Das Sarma J, Fu L, Hingley ST, Lai MM, Lavi E. Sequence analysis of the S gene of recombinant MHV-2/A59 coronaviruses reveals three candidate mutations associated with demyelination and hepatitis. *J Neurovirol*. 2001;7(5):432-6.
- Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(9):1032-45.
- Fan L, Wang T, Chang L, Song Y, Wu Y, Ma D. Systemic inflammation induces a profound long term brain cell injury in rats. *Acta Neurobiol Exp*. 2014;74(3):298-306.
- Fröhlich A, Olde Heuvel F, Rehman R, Krishnamurthy SS, Li S, Li Z, et al. Neuronal nuclear calcium signaling suppression of microglial reactivity is mediated by osteoprotegerin after traumatic brain injury. *J Neuroinflammation*. 2022;19(1):279.
- Fu HQ, Yang T, Xiao W, Fan L, Wu Y, Terrando N, et al. Prolonged neuroinflammation after lipopolysaccharide exposure in aged rats. *PLoS One*. 2014;9(8):e106331.

Glasnović A, O'Mara N, Kovačić N, Grčević D, Gajović S. RANK/RANKL/OPG signaling in the brain: a systematic review of the literature. *Front Neurol*. 2020;11:590480.

Glasnović A, Stojić M, Dežmalj L, Tudorić-Đeno I, Romić D, Jeleč V, et al. RANKL/RANK/OPG axis is deregulated in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients at clinical onset. *Neuroimmunomodulation*. 2018;25(1):23-33.

Gowrisankar YV, Clark MA. Angiotensin II regulation of angiotensin-converting enzymes in spontaneously hypertensive rat primary astrocyte cultures. *J Neurochem*. 2016;138(1):74-85.

Guerrini MM, Okamoto K, Komatsu N, Sawa S, Danks L, Penninger JM, et al. Inhibition of the TNF family cytokine RANKL prevents autoimmune inflammation in the central nervous system. *Immunity*. 2015;43(6):1174-85.

Hanada R, Leibbrandt A, Hanada T, Kitaoka S, Furuyashiki T, Fujihara H, et al. Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature*. 2009;462(7272):505-9.

Harada K, Kamiya T, Tsuboi T. Gliotransmitter release from astrocytes: functional, developmental, and pathological implications in the brain. *Front Neurosci*. 2016;9:499.

Jensen JK, Ueland T, Atar D, Gullestad L, Mickley H, Aukrust P, et al. Osteoprotegerin concentrations and prognosis in acute ischaemic stroke. *J Intern Med*. 2010;267(4):410-7.

Kesner RP. Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learn Mem*. 2007;14(11):771-81.

Kichev A, Eede P, Gressens P, Thornton C, Hagberg H. implicating receptor activator of NF- κ B (RANK)/RANK ligand signalling in microglial responses to toll-like receptor stimuli. *Dev Neurosci*. 2017;39(1-4):192-206.

Kichev A, Rousset CI, Baburamani AA, Levison SW, Wood TL, Gressens P, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) signaling and cell death in the immature central nervous system after hypoxia-ischemia and inflammation. *J Biol Chem*. 2014;289(13):9430-9.

Lavi E, Cong L. Type I astrocytes and microglia induce a cytokine response in an encephalitic murine coronavirus infection. *Exp Mol Pathol*. 2020;115:104474.

Lee NJ, Clarke IM, Enriquez RF, Nagy V, Penninger J, Baldock PA, et al. Central RANK signalling in NPY neurons alters bone mass in male mice. *Neuropeptides*. 2018 Apr;68:75-83.

Li Y, Fu L, Gonzales DM, Lavi E. Coronavirus neurovirulence correlates with the ability of the virus to induce proinflammatory cytokine signals from astrocytes and microglia. *J Virol*. 2004;78(7):3398-406.

Liu W, Zhang X. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review). *Mol Med Rep*. 2015;11(5):3212-8.

Nagy V, Penninger JM. The RANKL-RANK story. *Gerontology*. 2015;61(6):534-42.

Noguchi H, Li G, Pleasure SJ. Migration in the hippocampus. In: Rubenstein J, Chen B, Kolodkin A, Rakic P, Kwan KY, Anton E, editors. *Cellular migration and formation of axons and dendrites: comprehensive developmental neuroscience*. 2nd ed. London: Science Direct; 2020. p. 365-79.

Jensen T, Hayashi M, Sasaki F, Nakashima T. RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond. *Inflamm Regen*. 2020;40:2.

Papanastasiou AD, Sirinian C, Kalofonos HP. Identification of novel human receptor activator of nuclear factor- κ B isoforms generated through alternative splicing: implications in breast cancer cell survival and migration. *Breast Cancer Res*. 2012;14(4):R112.

S Peters, P Clézardin, I Márquez-Rodas, D Niepel, C Gedye The RANK-RANKL axis: an opportunity for drug repurposing in cancer? *Clin Transl Oncol*, 2019; 21(8):977-991

Shimamura M, Nakagami H, Osako MK, Kurinami H, Koriyama H, Zhengda P, et al. OPG/RANKL/RANK axis is a critical inflammatory signaling system in ischemic brain in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(22):8191-6.

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

Skrzypczak-Wiercioch A, Sałat K. Lipopolysaccharide-induced model of neuroinflammation: mechanisms of action, research application and future directions for its use. *Molecules*. 2022;27(17):5481.

Swanson, L. W. Structure of the rat brain. 1st edition, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands, 1992.

Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):7-35.

Sofroniew MV. Astrocyte reactivity: subtypes, states, and functions in cns innate immunity. *Trends Immunol*. 2020;41(9):758-70.

Song TJ, Kim J, Yang SH, Park JH, Lee HS, Nam CM, et al. Association of plasma osteoprotegerin levels with stroke severity and functional outcome in acute ischaemic stroke patients. *Biomarkers*. 2012;17(8):738-44.

Steardo L, Steardo L Jr, Zorec R, Verkhatsky A. Neuroinfection may contribute to pathophysiology and clinical manifestations of COVID-19. *Acta Physiol*. 2020;229(3):e13473.

Üstündağ M, Orak M, Güloğlu C, Tamam Y, Sayhan MB, Kale E. The role of serum osteoprotegerin and S-100 protein levels in patients with acute ischaemic stroke: determination of stroke subtype, severity and mortality. *J Int Med Res*. 2011;39(3):780-9.

Vainchtein ID, Molofsky AV. Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health. *Trends Neurosci*. 2020;43(3):144-154.

Von Dem Knesebeck A, RANK (TNFRSF11A) Is Epigenetically Inactivated and Induces Apoptosis in Gliomas.m Neoplasia. 2012. 14(6): 526–534

Xia H, Lazartigues E. Angiotensin-converting enzyme 2: central regulator for cardiovascular function. *Curr Hypertens Rep*. 2010;12(3):170-175

Zhu P, Zhang Z, Huang X, Liang S, Khandekar N, Song Z, et al. RANKL reduces body weight and food intake via the modulation of hypothalamic NPY/CART expression. *Int J Med Sci*. 2018;15(10):969-77.

ANEXOS

ANEXO A – Comissão de Ética no Uso de Animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Aracatuba

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL - CEUA
Formulário - Protocolo Para Uso de Animais em Pesquisa

Processo nº: 652 / 2023

1. Finalidade: PESQUISA Data de Início: 17/09/2023 Data de Término: 17/09/2024

2. Título do Projeto:

Análise do eixo RANK/RANKL/OPG e osteopontina no sistema nervoso de ratos adultos com indução experimental de neuroinflamação"

3. Título do Projeto em inglês:

Analysis of the RANK/RANKL/OPG axis and osteopontin in the nervous system of adult rats with experimental Induction of neuroinflammation

4. Responsável pela Pesquisa: Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti

Unidade: Faculdade de Odontologia do Campus de Aracatuba – FOA/UNESP

Departamento: Ciências Básicas Telefone/Ramal: 36362781

e-mail: claudio.casatti@unesp.br CPF: 13691873863

Currículo Lattes: https://lattes.cnpq.br/8487462626931877

5. Colaboradores:

Profa. Dra Alaide Gonçalves	Pesquisador
Unidade/Depto: Ciências Básicas	Telefone: 3636 2783
Prof. Dr. João Carlos Callera	Pesquisador
Unidade/Depto: Ciências Básicas	Telefone: 3636 2877
Bárbara Stéfani Silva da Costa	Graduando - IC
Unidade/Depto: Ciências Básicas	Telefone: 3636 2782
Vitória Morelli Savenhago	Graduando - IC
Unidade/Depto: Ciências Básicas	Telefone: 3636 2782
	Telefone: 3636 2782