



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CAMPUS PROFESSOR ANTÔNIO GARCIA FILHO
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA DE LAGARTO**

JOÃO VITOR OLIVEIRA DE AMORIM

**INFLUÊNCIA DE RIP2 NA DENSIDADE DE VOLUME ÓSSEO DO PROCESSO DE
CICATRIZAÇÃO ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS**

**LAGARTO
2021**

JOÃO VITOR OLIVEIRA DE AMORIM

**INFLUÊNCIA DE RIP2 NA DENSIDADE DE VOLUME ÓSSEO DO PROCESSO DE
CICATRIZAÇÃO ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS**

Trabalho apresentado ao Departamento da
Universidade Federal de Sergipe como requisito
parcial à obtenção do grau de Cirurgião-dentista

Orientador: Carlos Eduardo Palanch Repeke

Co-orientador: Ananda Resende da Mata

**LAGARTO
2021**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

Aos meus pais, que foram meu combustível e inspiração.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Palanch Repeke pela amizade, confiança e exemplo.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me fortalecer, guiar meu caminho e estar sempre comigo.

Ao meu orientador Carlos Eduardo Palanch Repeke pela instrução e conhecimento.

À minha coorientadora Ananda Resende da Mata pela ajuda e ensinamentos.

À equipe de professores da Universidade Federal de Sergipe por possibilitarem meu crescimento pessoal e formação profissional.

Aos meus colegas de turma por tornarem essa jornada um pouco mais fácil e por serem minha segunda família.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia de Lagarto (DOL) por estarem presentes durante o dia a dia, permitindo o funcionamento do nosso curso.

Aos meus pais por serem meu alicerce e me apoiarem em todos os momentos, e que mesmo longe sempre se fizeram tão presentes.

À minha irmã e minha avó por caminharem sempre ao meu lado.

Aos meus professores da Nova Escola e Sacramentinas que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Aos meus amigos que sempre estiveram comigo.

À todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **Universidade Federal de Sergipe (UFS)**, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, por proporcionar estrutura e ensino de qualidade, me permitindo conhecer a Odontologia em sua essência.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP)** por ceder o laboratório aonde foram realizadas as pesquisas contidas no presente trabalho.

Ao **Departamento de Odontologia de Lagarto (DOL)** por conduzir a minha formação através do nosso curso, possibilitando a produção de conhecimento e vivências que serão levados comigo no exercício da profissão.

RESUMO

INFLUÊNCIA DE RIP2 NA DENSIDADE DE VOLUME ÓSSEO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS

O adequado desenvolvimento do processo de reparo ósseo é fundamental para o restabelecimento da homeostasia tecidual e recuperação de suas funções, ou para possibilitar terapias reabilitadoras. Dentre as possíveis estratégias para a modulação terapêutica do reparo ósseo alveolar, podemos destacar a modulação da resposta imune/inflamatória, que se mostra extremamente importante ao processo de reparo ósseo, porém cujas funções ainda não são claramente compreendidas. RIP2 é uma molécula que atua na inicialização da resposta imune/inflamatória, através da sinalização intracelular após a ativação de receptores do tipo Nod (NLRs), seja em decorrência de um processo infeccioso ou por meio de algum dano tecidual. Uma vez que não são claros os mecanismos de "trigger" de mediadores inflamatórios no contexto do reparo ósseo, temos como objetivo do estudo caracterizar o papel de RIP2 na cinética de reparo ósseo subsequente à extração do incisivo superior de camundongos. Para tanto, utilizamos 16 animais geneticamente deficientes da molécula sinalizadora RIP2 (RIP2KO) e 16 da linhagem tipo-selvagem WT (*wildtype*). Foram destinados 2 animais de cada grupo para análise por microtomografia computadorizada (MCt) nos períodos de 7 e 14 dias após o procedimento cirúrgico, e mais 3 animais para análise histomorfométrica, para cada um dos grupos e períodos (0 hora, 7, 14 e 21 dias). Após a extração do incisivo, os animais foram sacrificados nos períodos determinados, e as amostras foram coletadas e preparadas para análise. Os espécimes foram escaneados, e as imagens reconstruídas e realinhadas (MCt). As amostras direcionadas para análise histomorfométrica foram coradas com HE, e analisadas com o auxílio de microscópio óptico binocular, para contagem de pontos coincidentes e posterior cálculo da densidade de volume. Por meio da análise de MCt observou-se que a ausência de RIP2 não interfere na cinética de formação óssea pós exodontia. Já através da análise quantitativa do tecido ósseo, foi possível observar algumas variações em relação ao tecido e seus componentes. A diferença na densidade de volume dos osteoblastos entre os grupos, nos períodos de 14 e 21 dias, chamou atenção por uma superioridade significativa do grupo RIP2KO, o que gerou hipóteses acerca de um possível atraso da maturação do tecido ósseo na ausência da molécula RIP2.

Palavras-chave: Osteogênese; Inflamação; Imunologia; Alvéolo dental; Camundongos.

ABSTRACT

INFLUENCE OF RIP2 ON THE BONE VOLUME DENSITY OF THE ALVEOLAR HEALING PROCESS IN MICE

The proper development of the bone repair process is fundamental for the restoration of tissue homeostasis and the recovery of its functions, or to enable rehabilitation therapies. Among the possible strategies for the therapeutic modulation of alveolar bone repair, we can highlight the modulation of the immune/inflammatory response, which is extremely important to the bone repair process, but whose functions are not yet clearly understood. RIP2 is a molecule that acts in the initialization of the immune/inflammatory response, through intracellular signaling after the activation of Nod like receptors (NLRs), either due to an infectious process or through some tissue damage. Since the trigger mechanisms of inflammatory mediators are not clear in the context of bone repair, we aim to characterize the role of RIP2 in the bone repair kinetics subsequent to extraction of the upper incisor from mice. For this purpose, we use 16 genetically deficient animals of the RIP2 signaling molecule (RIP2KO) and 16 animals wildtype (WT). 2 animals from each group were assigned for analysis by computerized microtomography (MCt) in the periods of 7 and 14 days after the surgical procedure, and another 3 animals for histomorphometric analysis, for each of the groups and periods (0 hora, 7, 14 e 21 dias). After the incisor extraction, the animals were sacrificed in the determined periods, and the samples were collected and prepared for analysis. The specimens were scanned, and the images were reconstructed and realigned. The samples targeted for histomorphometric analysis were stained with HE, and analyzed with the aid of a binocular optical microscope, for counting of coincident points and later calculation of the volume density. Through the MCt analysis, it was observed that the absence of RIP2 does not interfere with the bone formation kinetics after extraction. Although through the quantitative analysis of bone tissue, it was possible to observe some variations in the relation to the tissue and its components. The difference in the volume density of osteoblasts between the groups, in the periods of 14 and 21 days, drew attention due to a significant superiority of the RIP2KO group, which generated hypotheses about the possible delay in the maturation of bone tissue in the absence of RIP2 molecule.

Keywords: Osteogenesis; Inflammation; Immunology; Tooth socket; Mice.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Desenho esquemático representando a ativação dos receptores NLRs e TLRs. Fonte: Arquivo pessoal (2014)..... 20
- Figura 2** - Imagens tridimensionais das maxilas de camundongos da linhagem C57B1/6-WT obtidas por renderização de volume no software CTvox. Fonte: Arquivo pessoal (2014)..... 27
- Figura 3** - Representação esquemática da análise histomorfométrica. Fonte: Arquivo pessoal (2014)..... 29
- Figura 4** - Análise morfológica tridimensional por MicroCT (CTvox), do processo de reparo alveolar dos grupos WT e RIP2KO nos períodos de 7 e 14 dias pós-cirurgia. Fonte: Arquivo pessoal (2014)..... 33
- Figura 5** - Análise comparativa da densidade de volume (%) de tecido ósseo (a) e de seus componentes (b-d) presentes no alvéolo dental de camundongos WT e RIP2KO nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Fonte: Arquivo pessoal (2014)..... 35
-
-

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2	OBJETIVO.....	22
3	METODOLOGIA.....	24
3.1	Considerações éticas.....	24
3.2	Seleção da amostra.....	24
3.3	Metodologia para procedimentos cirúrgicos.....	25
3.4	Metodologia para coleta das amostras.....	25
3.5	Metodologia para análise descritiva por microtomografia computadorizada.....	26
3.6	Medologia para procedimentos histotécnicos.....	27
3.7	Metodologia para análise histomorfométrica.....	28
3.8	Análise dos dados.....	30
4.	RESULTADO	32
4.1	Análise descritiva por MicroCT do processo de reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos.....	32
4.2	Análise histomorfométrica comparativa do processo de reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos.....	34
4.2.1	Papel de RIP2 na densidade de volume de tecido ósseo durante o reparo alveolar em camundongos.....	35
5	DISCUSSÃO.....	38
6	CONCLUSÕES.....	42
	REFERÊNCIAS.....	44
	ANEXO.....	47

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O osso é um tecido conjuntivo especializado caracterizado por possuir uma matriz extracelular mineralizada, cuja composição tem como principal elemento estrutural o colágeno tipo 1, e sua mineralização é proveniente, predominantemente, do fosfato de cálcio na forma de cristais de hidroxiapatita. Além disso possui outras proteínas não-colágenas que contribuem para sua conformação, dentre as quais se encontram algumas citocinas e fatores de crescimento que lhe permitem possuir um alto grau de renovação através da reabsorção e deposição de matriz óssea, que só é possível graças à presença de determinados tipos celulares. Essa parte celular do osso é composta, basicamente, por osteoclastos, osteoblastos e osteócitos (ROSS, MICHAEL H.; PAWLINA, 2012). Os osteoclastos atuam no processo de reabsorção óssea, seja ele para possibilitar a remodelação óssea ou por distúrbios patológicos que desencadeiam desequilíbrio dos fatores osteoclastogênicos. O aumento do RANKL (ligante do receptor de ativação do fator nuclear κ B), por exemplo, é o principal fator para o aumento da diferenciação de osteoclastos através da ligação ao receptor RANK (receptor de ativação do fator nuclear κ B) presente nas células precursoras, o que pode resultar, conseqüentemente, no aumento da reabsorção óssea. Os níveis de RANKL passíveis de atuação são regulados pelo OPG (osteoprotegerina), assim como os seus sítios de atuação, através da inibição da ligação RANK/RANKL. Já os osteoblastos atuam na osteogênese, e em casos em que o organismo necessita formar osso, moléculas relacionadas à sua diferenciação e ativação, como o fator de transcrição Runx2; osteocalcina (OCN) e colágeno tipo 1 (COL-1) – proteínas produzidas durante a deposição de matriz orgânica; fosfatase alcalina (ALP) – proteína produzida durante o processo de mineralização, se encontram mais elevadas. Após ser envolto por matriz óssea, o osteoblasto reduz seu metabolismo e passa a atuar mais direcionado à manutenção do tecido ósseo e não em função da sua neoformação, passando a ser chamado de osteócito (ASAGIRI; TAKAYANAGI, 2007; TAKAYANAGI, 2007).

A regeneração óssea é um processo bastante complexo, que não depende somente da atuação de osteoblastos e osteoclastos, e de extrema importância para a odontologia visto que é uma etapa importante para diversos procedimentos reabilitadores, tais como exodontias, enxertos, implantes, cirurgias ortognáticas. De forma mais ampla podemos entender que o processo de reparo pós-extração, por exemplo, se inicia com a formação de um coágulo, que vai gradativamente dando origem a um tecido de granulação onde irão atuar as células,

citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento. Esses elementos estão envolvidos na resposta do organismo para reestabelecer a homeostase, através do recrutamento de outras células, formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), deposição de material para recuperação do tecido ósseo mineralizado, que a partir daí será maturado, com a formação de canais medulares, originando um tecido mais semelhante ao que foi perdido (TAZIMA; DE ANDRADE VICENTE; MORIYA, 2008; VIEIRA *et al.*, 2015).

Esse processo envolve diversos mecanismos de ação, incluindo uma resposta imune/inflamatória do organismo, dependente do estímulo, através de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), em casos de infecção, por exemplo, ou Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) que são moléculas endógenas liberadas em caso de lesões teciduais, que vão desencadear uma série de acontecimentos com a finalidade de combater determinado invasor e/ou iniciar o processo de reparo. Apesar das diferentes origens, os padrões moleculares podem resultar em respostas semelhantes. Essas moléculas são “percebidas” pelo organismo através de receptores presentes nas células, sejam eles intra ou extracelulares. Os receptores do tipo toll (TLRs) e do tipo nod (NLRs) são exemplos disso, possuindo diferentes tipos e funções, estão presentes em células como macrófagos, fibroblastos, células dendríticas e do tecido ósseo, e são capazes de identificar DAMPs e PAMPs para desencadear a cascata de sinalização pós ativação gerando uma resposta do organismo ao final. Ambos utilizam o mesmo domínio (LLR – Leucine-rich repeat), porém a cascata de sinalização intracelular são bastante distintas. A partir do momento em que essas ligações ocorrem (DAMPs/PAMPs – TLRs/NLRs), as células que foram sinalizadas começam a atuar conforme esse estímulo, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- α), que geram uma retroalimentação positiva do próprio TNF- α e de outras citocinas, estimulando também o aumento na produção de receptores e de quimiocinas. Em decorrência do aumento dessas quimiocinas ocorre também uma maior migração das células envolvidas nessa resposta imune para atuar localmente, como leucócitos, macrófagos, células B. Dentre os fatores que sofrem aumento por influência desses acontecimentos também se encontram o RANKL e o RANK, dessa forma com o aumento das citocinas, quimiocinas, células e receptores, a cascata inflamatória é amplificada, isso quer dizer que também ocorrerá um aumento da osteoclastogênese, gerando um aumento da reabsorção e inibição da neoformação óssea. Ainda não é muito claro como a inflamação, apesar de apresentar uma resposta que estimule a reabsorção do tecido ósseo e cause a inibição de sua deposição, possa ser um evento importante e benéfico para o processo de reparo do osso (AKIRA, S., 2000; AKIRA, SHIZUO; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; FUKATA; VAMADEVAN; ABREU, 2009).

Como já foi relatado os receptores TLRs e NLRs possuem um mecanismo de sinalização dentro da célula distinto, o primeiro passando pela proteína MyD88, enquanto o segundo segue através do RIP2. Então para entender a participação do RIP2, ou como também chamado RICK, na reação inflamatória e consequentemente no reparo ósseo, é necessário compreender a cascata de sinalização intracelular após a ativação dos receptores NLRs. A família dos receptores do tipo NOD possuem 4 grupos distintos com seus respectivos domínios, no qual os receptores do tipo NOD1 e NOD2, que estão presentes no citosol, estão relacionados com o RIP2. O NOD tipo 1 é responsável pelo reconhecimento do ácido dipeptídeo γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelic (iE-DAP), enquanto o NOD tipo 2 do muramyl dipeptídeo (MDP), que são polipeptídeoglicanas presentes nas bactérias gram-positivas. Então, a partir do momento em que esses receptores reconhecem essas polipeptídeoglicanas, eles irão ativar os fatores de transcrição MAPK e NF κ B, através da interação com o RIP2, que é uma molécula intracelular denominada kinase serina-teonina. Os fatores de transcrição irão proporcionar um aumento na expressão das citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez, também exercem influência nos receptores NOD tipo 1 e 2 podendo modular positivamente a expressão dos mesmos, como é o caso da atuação do TNF- α e IFN- γ nas células epiteliais. Esse é um exemplo claro de como a cascata inflamatória pode ser auto amplificada, e por isso mecanismo importante a ser considerado no estudo da cicatrização óssea (ANG *et al.*, 2009; KOBAYASHI *et al.*, 2002; PERES; LAMANO, 2011; TADA *et al.*, 2005; TAKAYANAGI, 2005).

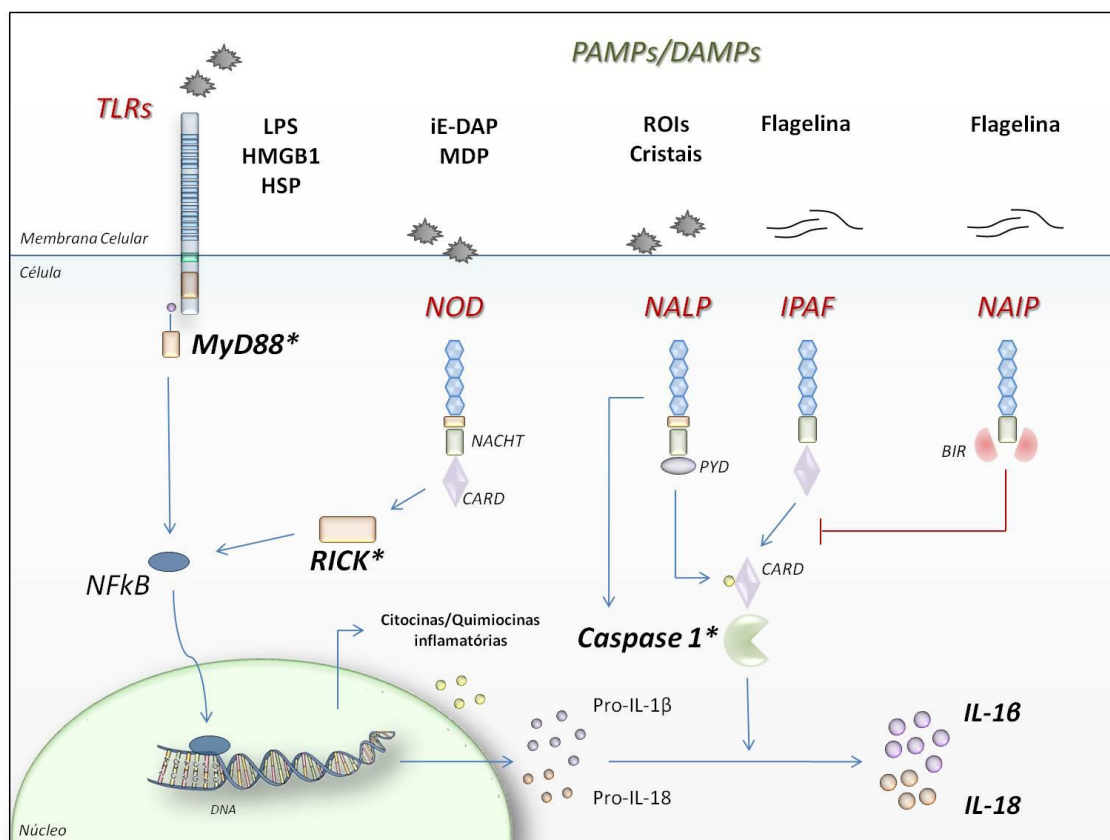


Figura 1 - Desenho esquemático representando a ativação dos receptores TLRs e NLRs (NOD, NALP, IPAF e NAIP) por PAMPs e DAMPs e posterior sinalização intracelular. Setas da cor azul determinam indução/ativação; Setas vermelhas determinam inibição.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Caracterizar o papel da molécula RIP2 na cinética de reparo ósseo alveolar em camundongos.

3 METODOLOGIA

3 METODOLOGIA

3.1 Considerações éticas

Este trabalho foi realizado sob aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa com Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (CEEPA – #029/2012).

3.2 Seleção da amostra

Para o presente estudo, foram utilizados ao todo 32 camundongos machos, com idade aproximada de 8 semanas, sendo 16 animais da linhagem tipo-selvagem C57Bl/6 WT (*wildtype*) e 16 animais geneticamente deficientes (*knockout*, KO) para RIP2; constituindo portanto dois grupos: WT e RIP2KO. Os camundongos foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP). Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, recebendo água *ad libitum*, e ração sólida (Ração Ativada Produtor - Anderson & Clayton S.A.) sem restrição, com exceção das primeiras 24 horas pós-cirurgia, em que essa alimentação foi triturada. Somente camundongos machos foram utilizados nesta pesquisa, a fim de evitar possíveis influências das variações hormonais sobre o processo de reparo ósseo alveolar.

Os 32 animais foram submetidos à exodontia do incisivo superior direito e mortos ao final dos períodos experimentais pré-estabelecidos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias. Para os períodos de 7 e 14 dias, foram utilizados 2 animais de cada grupo para obtenção de imagens por microtomografia computadorizada (MicroCT), e mais 3 animais por grupo e período (0 hora, 7, 14 e 21 dias) para as análises histomorfométricas.

3.3 Metodologia para procedimento cirúrgico

Para a realização da exodontia do incisivo superior direito, os animais foram submetidos à anestesia geral administrada via intramuscular, por meio de uma combinação do sedativo cloridrato de quetamina (15mg/kg - Dopalen[®], Agribrans do Brasil LTDA) e do relaxante muscular xilazina (10mg/kg - Anasedan[®], Agribrans do Brasil LTDA). Com o animal anestesiado, realizou-se a antissepsia da área cirúrgica com iodo tópico (Dermoidine[®] - Gessy Lever Industrial Ltda.) e o incisivo foi extraído por meio de adaptação da técnica de exodontia em ratos utilizada por outros autores (OKAMOTO; DE CAMPOS RUSSO, 1973). Para tanto, foram utilizados instrumentos adaptados: a extremidade curva de uma sonda exploradora nº 5 devidamente afiada para desinserção dos tecidos moles e luxação, e uma pinça previamente desgastada para a apreensão e extração propriamente dita do dente (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013). Em virtude do tamanho reduzido da área cirúrgica, foi utilizado um microscópio estereoscópico (DF Vasconcelos) nos aumentos de 16x e 25x.

3.4 Metodologia para coleta das amostras

Ao final de cada período experimental (0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia), os animais foram sacrificados por meio de injeção de dose excessiva de anestésico via intramuscular. Posteriormente, as amostras constituídas pelas maxilas contendo os alvéolos foram coletadas com o emprego de uma lâmina nº 20 acoplada ao cabo de bisturi.

As amostras destinadas à análises em MicroCT e análises microscópicas foram fixadas em solução de formol tamponado a 10% (pH 7,2), armazenadas em temperatura ambiente e posteriormente lavadas em água corrente (“over-night”). Antes de serem desmineralizadas e processadas para as análises microscópicas, essas peças foram temporariamente acondicionadas em fixador alcoólico (etanol hidratado 70%) e encaminhadas para obtenção das imagens em MicroCT (SkyScan 1174). O acondicionamento em etanol 70% foi um cuidado adicional, cujo objetivo foi de manter a fixação previamente obtida com o formol, mas evitar a superfixação do tecido por este primeiro reagente, o que poderia desnaturar os antígenos necessários para uma futura marcação de imuno-histoquímica.

3.5 Metodologia para análise descritiva por microtomografia computadorizada

A MicroCT foi empregada como um método complementar, para permitir uma análise descritiva por reconstrução tridimensional (3D) do reparo ósseo alveolar durante os diferentes períodos experimentais (7 e 14 dias) em todos os grupos, facilitando também o entendimento anatômico do modelo experimental, conforme exemplificado na Figura 2. Para tanto, as maxilas coletadas acondicionadas em fixador alcoólico, foram escaneadas em MicroCT da marca SkyScan, modelo 1174 (Kontich, Bélgica), da disciplina de Endodontia da FOB/USP, bem como reconstruídas e analisadas com softwares próprios do aparelho (NRecon, Dataviewer, e CT-Vox).

O escaneamento das maxilas foi realizado com um tempo de aquisição de 33 minutos, utilizando-se os seguintes parâmetros tomográficos: 50 kV, 800 uA, com filtro de 0,5 mm Al, com 180 graus de rotação e intervalo de exposição de 1 grau, sendo as imagens capturadas com uma resolução de 1304 x 1024 pixels, com um tamanho de voxel de 14,12 µm.

As imagens obtidas a partir das maxilas escaneadas ("slices" ou cortes tomográficos) foram reconstruídas no software NRecon v1.6.4.8 (Skyscan), com parâmetros de reconstrução padronizados para todas as amostras. Na sequência, para obtenção das imagens tridimensionais em diferentes planos de secção (transaxial e sagital), as imagens reconstruídas no software NRecon foram realinhadas no software DataViewer1.4.4.0, e posteriormente reconstruídas em 3D no software CTvox 2.3, por meio de renderização de volume, técnica que permite uma análise interativa da morfologia óssea de todo o alvéolo dental (Figura 2).

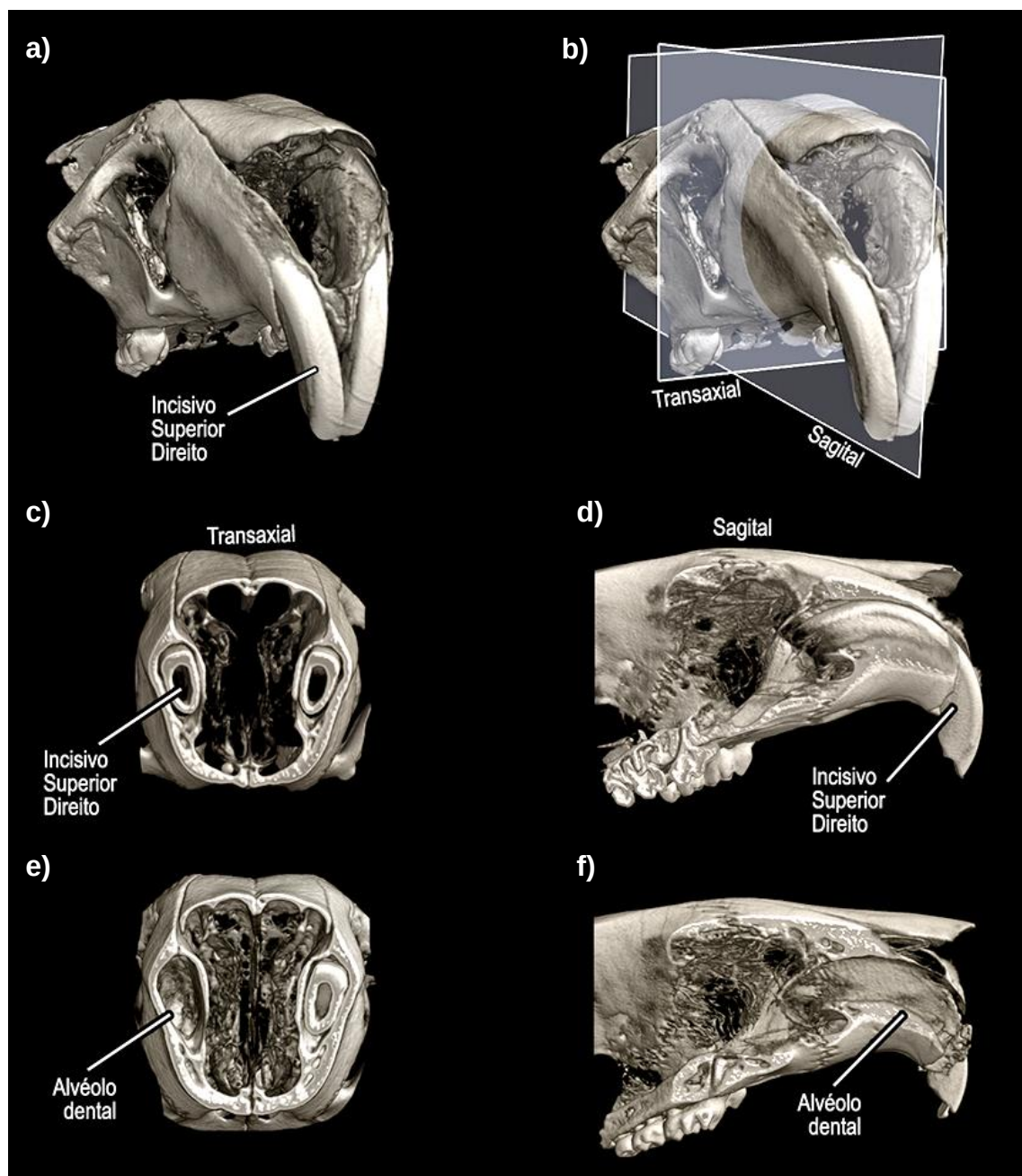


Figura 2 -Imagens tridimensionais das maxilas de camundongos da linhagem C57Bl/6-WT obtidas por renderização de volume no software CTvox. Em (a,b,c,d) observa-se a maxila sem a exodontia do incisivo superior direito. A imagem (b) ilustra o sentido dos planos de secção transaxial (equivalente ao plano transversal utilizado para os cortes histológicos) e o plano sagital (longitudinal). Em (c) e (e) observa-se a maxila seccionada no plano transaxial, na altura da porção média do alvéolo dental, com e sem exodontia do incisivo superior direito. (d) e (f) apresentam a mesma sequência no plano de secção sagital.

3.6 Metodologia para procedimentos histotécnicos

Após a fixação em formol por 24 horas, acondicionamento em fixador alcóolico e escaneamento em MicroCT, as amostras foram lavadas e desmineralizadas em solução de EDTA pH 7,2 (solução contendo 4,13% de Titriplex III Merck® e 0,44% de hidróxido de sódio)

à temperatura ambiente, por um período aproximado de quarenta dias, respeitando as trocas semanais da solução desmineralizadora e monitoramento por meio da análise radiográfica.

Posteriormente, as amostras foram lavadas em água corrente por 24 horas visando à total remoção de EDTA, e em seguida submetidas à técnica de rotina para inclusão em parafina Histosec® (parafina + resina). Para inclusão, procedeu-se a desidratação das amostras em 3 banhos de soluções de etanol 100% (dois banhos de 4 horas, seguidos de um banho de 12 horas). Em seguida as amostras desidratadas passaram por 3 banhos de 1 hora em soluções de xilol, e por fim foram incluídas em parafina para confecção dos blocos.

Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos semi-seriados no sentido transversal (perpendicular ao longo eixo do alvéolo dental), utilizando-se um micrótomo Leica Jung RM 2045. Foram obtidos cortes de 4 µm de espessura para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), para coloração com *Picrosirius Red*, bem como para uma futura e possível análise pela técnica de imuno-histoquímica, com intervalos de 500 µm, abrangendo o terço médio do alvéolo. Todo o processo histológico foi realizado no laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP).

3.7 Metodologia para análise histomorfométrica

A análise histológica foi realizada com emprego de um microscópio óptico binocular (OLYMPUS, modelo CH-2), sendo considerado o terço médio do alvéolo dental dos diferentes períodos experimentais (0 hora, 7, 14 e 21 dias) para ambos os grupos (WT e RIP2KO).

A análise histomorfométrica foi realizada por meio da avaliação da densidade de volume das estruturas constituintes do tecido alveolar durante o reparo, sendo considerados os seguintes parâmetros histológicos:

- matriz óssea
- osteoblastos
- osteoclastos

Dos parâmetros histológicos supracitados, aqueles correspondentes ao tecido ósseo (matriz óssea, osteoblastos e osteoclastos), também foram analisados em conjunto, sendo somadas as densidades de volume das estruturas correspondentes a cada tecido, proporcionando um dado mais abrangente para análise da cinética do reparo.

A densidade de volume foi obtida por meio de contagem de pontos coincidentes sobre os critérios histológicos supracitados, com o emprego de uma lente ocular de compensação ZEISS kpl 8x (Carl-Zeiss Micro Imaging Inc.), contendo uma grade ou retículo de integração II ZEISS e uma objetiva de imersão com o aumento de 100x, em microscópio óptico binocular (JENAMED 2 (Carl-Zeiss). O retículo de integração utilizado constitui uma grade composta por um quadrado que limita a área a ser estudada, e que contém um conjunto de 10 linhas paralelas sucessivas, divididas igualmente por 10 pontos, formando um sistema de 100 pontos (Figura 3a). Assim, a sobreposição do retículo sobre o campo histológico permitiu a contagem de estruturas que fossem coincidentes com os pontos do retículo, sendo considerados ao todo 13 campos microscópicos distintos, dispostos regular e sistematicamente sobre um único corte histológico. Para cada animal, foram considerados pelo menos 3 cortes histológicos abrangendo o terço médio do alvéolo, sendo portanto contados ao todo 39 campos, conforme demonstrado na Figura 3-b. Os campos foram escolhidos com intervalos regulares em cada corte, de maneira a se obter uma amostra representativa de toda área do corte (WEIBEL, 1969).

O cálculo da densidade de volume (Dv) foi obtido pela contagem de pontos coincidentes sobre as estruturas consideradas (Pi) e o número total de pontos existentes no retículo (P), sendo adotada a seguinte regra ($Dv = 100 \times [\Sigma Pi / \Sigma P]$). O total de pontos ocupados pelo alvéolo foi considerado 100%, sendo Pi estabelecido como percentual relativo a este, ocupado por cada uma das estruturas consideradas com os valores resultantes da contagem dos 3 cortes histológicos de cada animal. Posteriormente foram calculadas a média e o desvio padrão dos percentuais obtidos nos animais pertencentes ao mesmo grupo.

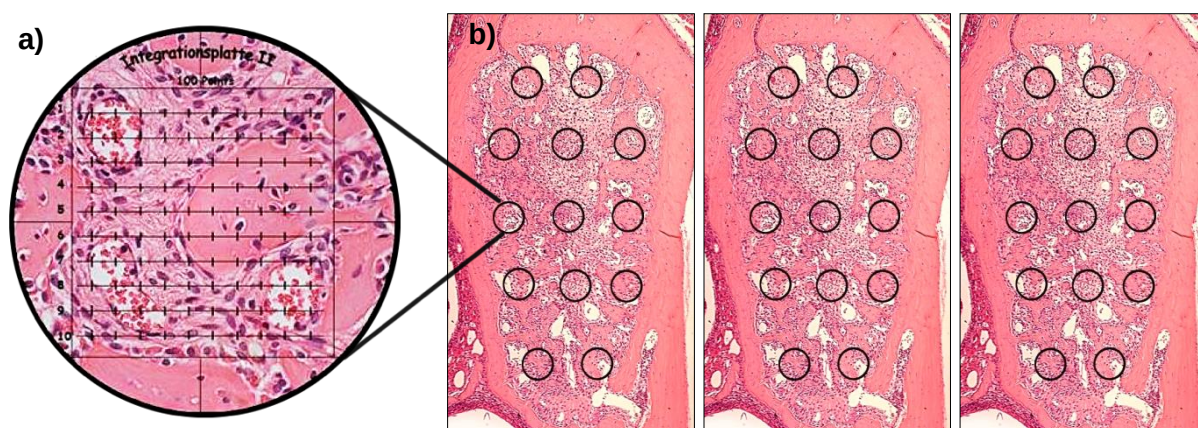


Figura 3 -Representação esquemática da análise histomorfométrica. Em (a) retículo de integração (II ZEISS) sobreposto a um corte histológico formando um campo contendo 100 pontos equidistantes (10x10) e sua distribuição regular por 13 campos sobre o corte histológico em (b), totalizando 39 campos nos 3 cortes histológicos do terço médio do alvéolo pós-exodontia.

3.8 Análise dos dados

As análises entre três ou mais tempos, como os dados relativos à análises microscópicas quantitativas foram submetidos ao teste estatístico de Análise de Variância one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tuckey. Para análises entre apenas dois tempos ou amostras, foi utilizado o teste t-student. Para todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes estatísticos, adequados aos experimentos, grupos e valores obtidos foram aplicados utilizando os programas GraphPadInStat e GraphPad Prisma 5 (GraphPad Software, San Diego, CA).

4 RESULTADO

4 RESULTADO

4.1 Análise descritiva por MicroCT do processo de reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos

Por meio da reconstrução tridimensional das maxilas escaneadas em MicroCT (CT-Vox), demonstrou-se comparativamente o processo de reparo ósseo alveolar dos grupos (WT, RIP2KO) ao longo dos tempos de 7 e 14 dias pós-exodontia. Para melhor representar a evolução do reparo nas regiões mais centrais do alvéolo, elegeu-se o plano de secção transaxial, na altura do terço médio do alvéolo dental, e o plano de secção sagital na região medial em relação ao longo eixo do alvéolo. Dentro de uma escala de densidade tomográfica, as estruturas mais claras (hiperdensas) representam o tecido ósseo maduro que compunha as demais estruturas ao redor do alvéolo dental, servindo como parâmetro de comparação com a densidade tomográfica observada na área do alvéolo dental ao longo dos diferentes períodos (Figura 4).

No período de 7 dias observou-se uma cavidade hipodensa do lado direito das maxilas, nos planos de secção transaxial dos grupos analisados, o qual é correspondente ao alvéolo dental pós exodontia, delimitado lateralmente pela paredes da cortical alveolar hiperdensa e por regiões hiperdensas relativas às estruturas de fundo. Em relação ao plano sagital, Nota-se no período de 7 dias um espaço hipodenso no interior dos alvéolos, possivelmente correspondente ao tecido de granulação e coágulo remanescente (Figura 4).

Aos 14 dias, observou-se tecido ósseo neoformado preenchendo uma maior parte do interior dos alvéolos, evidente pela presença trabéculas óssea neoformadas e mineralizadas visualizadas nos dois planos de secção, transaxial e sagital, em ambos os grupos de camundongos aqui analisados. No corte sagital, observa-se também aos 14 dias nos dois grupos, uma estrutura hiperdensa mais organizada na região apical dos alvéolos, que se trata do germe dental remanescente (Figura 4).

De uma forma geral, concluí-se que camundongos WT e RIP2KO apresentaram morfológicamente um processo de reparo muito semelhante ao longo dos períodos experimentais em relação à formação de tecido ósseo, o qual foi claramente distinguível nas imagens reconstruídas.

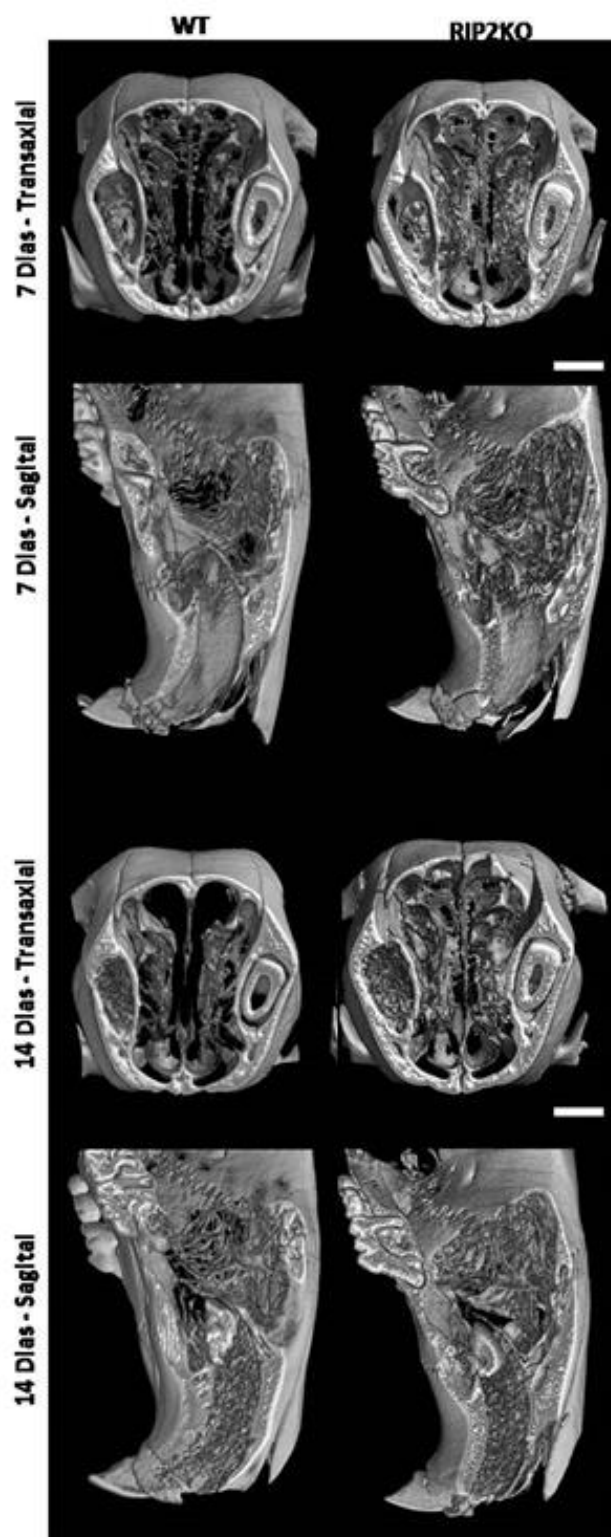


Figura 4 - Análise morfológica tridimensional por MicroCT (CTvox), do processo de reparo alveolar dos grupos WT e RIP2KO nos períodos de 7 e 14 dias pós-cirurgia. A imagem ilustra na parte superior o sentido dos planos de secção transaxial (equivalente ao plano transversal utilizado para os cortes histológicos) e logo abaixo o plano sagital (longitudinal) nos períodos de 7 dias e posteriormente 14 dias. Barra de escala = 0,5 mm.

4.2 Análise histomorfométrica comparativa do processo de reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos

Para a análise quantitativa, as estruturas descritas previamente foram categorizadas dentro de diferentes parâmetros histológicos, tais como: matriz óssea, osteoblastos, osteoclastos e outras estruturas; sendo que, os parâmetros relativos ao tecido conjuntivo e tecido ósseo também foram analisados em conjunto, por meio da soma das densidades de volume das estruturas correspondentes a cada um destes tecidos. Dessa forma, cortes histológicos do terço médio do alvéolo dental dos camundongos foram corados em HE, após foram sistematicamente quantificados por meio de cálculo de densidade de volume (%), permitindo assim uma análise comparativa dos eventos ocorridos entre os grupos WT e RIP2KO durante os períodos de 7, 14, e 21 dias.

4.2.1 Papel de RIP2 na densidade de volume de tecido ósseo durante o reparo alveolar em camundongos

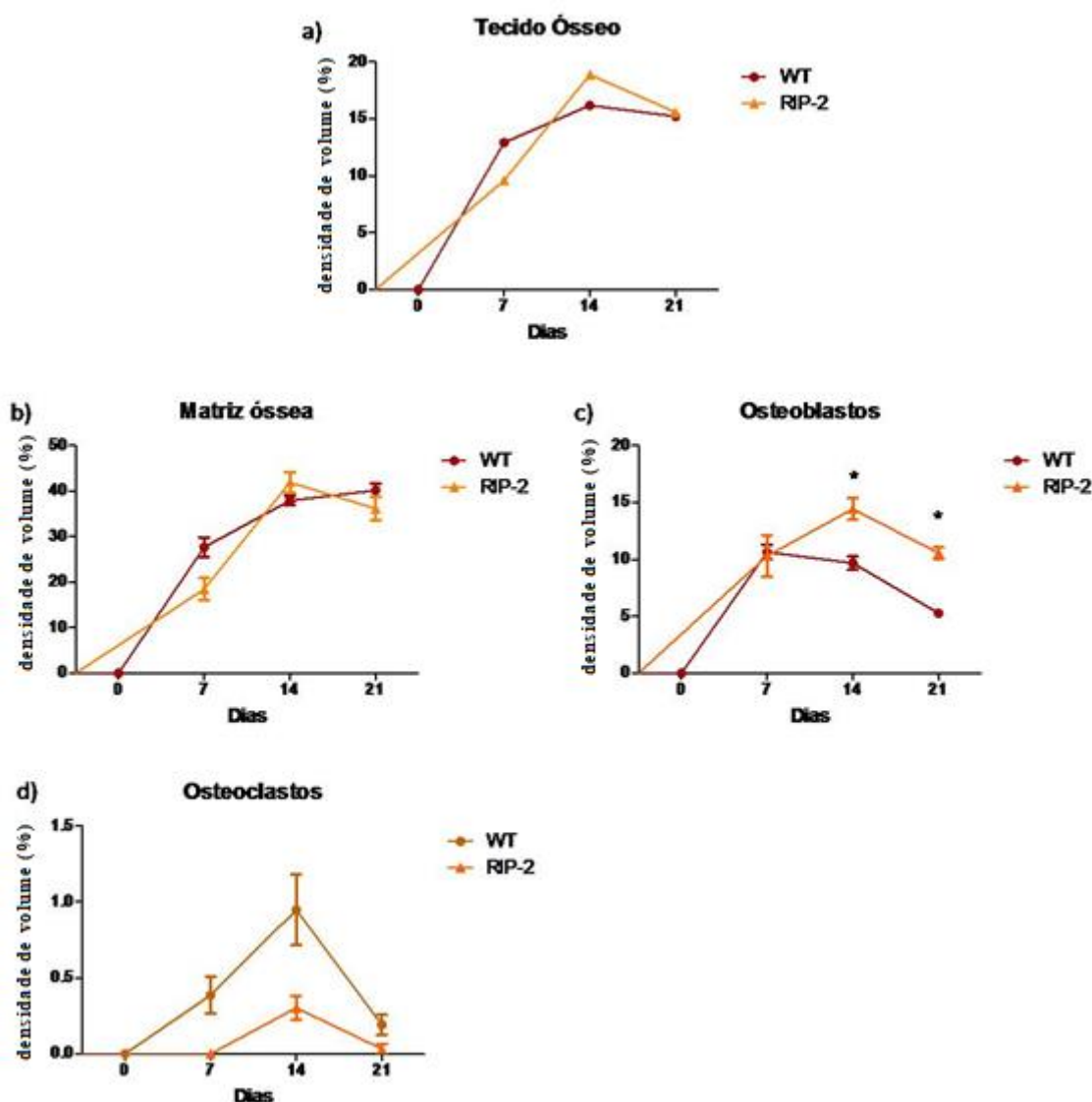


Figura 5 - Análise comparativa da densidade de volume (%) de tecido ósseo (a) e de seus componentes (b-d) presentes no alvéolo dental de camundongos WT e RIP2KO nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. *($p < 0,05$) indica diferenças estatisticamente significantes entre os grupos WT e RIP2KO, dentro do mesmo período experimental.

No que diz respeito à densidade de volume do tecido ósseo como um todo (gráfico a), os animais Knockout para o RIP2, no período de 7 dias, apresentaram valores de densidade inferiores àqueles que possuem essa molécula (WT). Já no período de 14 dias ocorre uma inversão nos valores, nos quais o grupo RIP2KO apresentou superioridade na densidade de volume de tecido ósseo. Por fim aos 21 dias, ambos os grupos apresentaram valores semelhantes para a densidade.

Quanto aos componentes do tecido ósseo, foram especificados os resultados referentes à matriz óssea (gráfico b), aos osteoblastos (gráfico c) e aos osteoclastos (gráfico d). Com relação à matriz óssea, nos tempos de 7 e 14 dias, observou-se um padrão similar em relação ao tecido ósseo, no qual os camundongos WT apresentaram maior densidade no primeiro intervalo de tempo em comparação aos camundongos RIP2KO, e aos 14 dias o oposto é observado. Entretanto no período de 21 dias o grupo WT apresentou pequena superioridade.

Já em relação aos osteoblastos, a densidade de volume apresenta valores próximos entre os grupos no período de 7 dias. No intervalo de tempo entre o sétimo e o décimo quarto dia a densidade de volume para os osteoblastos do grupo WT sofre uma redução, enquanto no grupo RIP2KO ocorre um aumento. Já entre o dia 14 e o dia 21, a densidade de volume do RIP2KO também passa a decair, porém a diferença estabelecida entre os grupos se mantém significativa.

Por fim, a densidade de volume referente aos osteoclastos se mostrou menor para o grupo RIP2KO em todos os períodos registrados, porém com uma diferença mínima e pouco significativa.

Dentre todos os componentes do tecido ósseo analisados, observa-se diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas nos tempos de 14 e 21 dias, em que os camundongos RIP2KO apresentaram uma maior densidade de volume de osteoblastos quando comparados com os camundongos WT ($p < 0,05$; Figura 5c).

De acordo com o exposto, conclui-se que o RIP2 não interfere na cinética de reparo ósseo alveolar, pois apesar de influenciar na quantidade de osteoblastos de forma significativa nos períodos mencionados, os resultados mostram que ambos os grupos (WT e RIP2) passaram pelo processo de cicatrização sem prejuízos ao final.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A descoberta das sinalizações mediadas por TLRs e NLRs vem abrindo uma interessante janela para o estudo entre a relação do sistema imune e ósseo (osteimunologia). Intervenções clínicas na intensidade da resposta imune/inflamatória vêm sendo intensamente utilizada através de drogas já existentes e comercializadas, como a inibição inespecífica de componentes desta resposta (com AINES), a qual influencia negativamente a qualidade da formação óssea (KALYVAS; TARENIDOU, 2008). Assim, uma possível modulação de moléculas mais específicas mudando o direcionamento das vias de sinalização e alvos moleculares inflamatórios podem ajudar na identificação dos eventos inflamatórios e imunológicos realmente importantes para o processo de reparo ósseo, assim como aqueles que potencialmente atrasam tais processos, resultando em possibilidades terapêuticas diretas e extremamente específicas. Dessa forma, objetivamos elucidar a importância da resposta inflamatória deflagrada potencialmente por PAMPs e DAMPs, produzidos e/ou liberados durante a cirurgia de extração do incisivo superior de camundongos, utilizando animais geneticamente deficientes da molécula sinalizadora RICK, essencial para a sinalização via receptores da família NLRs e consequentemente, essencial para a inicialização da resposta imune/inflamatória. Assim, foi realizada uma análise histológica minuciosa em relação ao volume de densidade óssea e células envolvidas no processo de reparo ósseo alveolar.

Adicionalmente, embora as análises histológicas forneçam informações exclusivas sobre processos e identificações celulares e a dinâmica tecidual do reparo ósseo, foi utilizado também imagens tridimensionais obtidas a partir de *MicroCT*, para uma análise descritiva do reparo alveolar nas diferentes linhagens. Quanto aos tempos experimentais, estes também foram definidos conforme padronização prévia em camundongos WT (C57Bl/6) (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013) considerando o tempo de 21 dias como um estágio de finalização do processo de reparo, em virtude da presença de tecido ósseo lamelar permeado por medula já nesta etapa, e pela maior quantidade de osso observada em relação aos tempos posteriores.

Nas reconstruções tridimensionais obtidas por *MicroCT*, foi observado no período de 7 dias pós extração, uma hipodensidade correspondente à região ocupada por tecido de granulação e osteoide, tanto em animais WT como nos animais geneticamente modificados. Posteriormente, a presença das trabéculas ósseas mineralizadas preenchendo toda extensão do alvéolo foi evidente pela hiperdensidade de estruturas notáveis a partir dos 14 dias. Embora não

tenhamos notado diferenças entre os grupos nesta análise descritiva, consideramos futura padronização de uma análise morfométrica por esta metodologia, que possa servir para comparação da qualidade do tecido ósseo entre os grupos, por meio de parâmetros como densidade óssea, arquitetura trabecular e volume tecidual (BOUXSEIN *et al.*, 2010).

De uma forma bem generalista, notou-se uma sequência de reparo similar entre camundongos WT e geneticamente modificados (RIP2KO), com uma adequada formação de coágulo sanguíneo no período de 0 hora até o completo preenchimento dos alvéolos dentais com tecido ósseo maduro permeado por tecido medular aos 21 dias, passando pelo estágio inflamatório ao redor do sétimo dias e de intensa atividade de remodelação óssea ao décimo quarto dias. Tais resultados são compatíveis com a cronologia de reparo ósseo alveolar em camundongos WT, já descrita em trabalhos anteriores (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013). Desta forma, a primeira observação concreta foi que a ausência de RIP2 não foi capaz de impossibilitar a completa regeneração óssea alveolar pós-extração do incisivo em camundongos. Assim, apesar das particularidades que cada uma delas desenvolveu no processo de reparo ósseo, ao final dos 21 dias pós-extração o alvéolo se encontrava totalmente reparado. Adicionalmente, a ausência da proteína RIP2 não alterou a ordem cronológica dos eventos, fato este que pode descredibilizar a importância de tais alvos a primeira vista, porém é essencial do ponto de vista farmacológico, uma vez que o objetivo a longo prazo de estudos de reparo ósseo é facilitar e agilizar o processo e não pará-lo por completo ou atrapalhá-lo.

Porém, apesar da sequência de eventos no reparo ósseo alveolar demonstrar certa semelhança entre as amostras, a ausência de RIP2 foi capaz de interferir na quantidade e/ou intensidade da resposta em determinados períodos de tempo.

No primeiro estágio do processo de reparo, imediatamente após a exodontia, ocorre a formação e subsequente maturação do coágulo sanguíneo. Tal processo inicia uma série de eventos celulares e moleculares que resultam gradualmente no estabelecimento do tecido de granulação e do processo inflamatório, de modo que o coágulo organizado serve como um arcabouço provisório para invasão de células constitutivas, leucócitos e novos capilares sanguíneos, além de contribuir inicialmente para a liberação diversos fatores de crescimento e citocinas, oriundos de plaquetas ativadas (BURNOUF *et al.*, 2013; NURDEN, 2011).

Ao analisar o papel de RIP2 no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos. A proteína RIP2 bloqueia a sinalização via receptores NOD1 e NOD2. Esses receptores ativam o fator de transcrição NFκB exclusivamente via interação com uma molécula intracelular kinase

serina-teonina (RIP2), também chamada de RICK (Figura 1). Assim, a ausência de RIP2 interfere na ativação do mesmo fator de transcrição (NFkB).

O grupo RIP2KO apresentou um visível aumento na contagem da densidade de volume. Esse atraso na degradação do coágulo pode estar refletindo novamente na densidade de volume das células inflamatórias, as quais também se apresentam significativamente maior no período de 7 dias pós extração comparadas ao grupo controle. Desta forma, observamos que a ausência da proteína intracelular RIP2 e a consequente inativação dos receptores NOD1 e NOD2 foram determinantes no atraso da remoção do coágulo e na cinética de migração das células inflamatórias. Assim, nos parece que a proteína RIP2 demonstra um papel mais participativo nos períodos iniciais do quadro inflamatório do reparo ósseo alveolar asséptico.

Assim, tendo em vista nossos resultados observamos que os receptores de reconhecimento padrão (NLRs, no caso do RIP2) participam do processo de reparo ósseo alveolar em camundongos alterando algumas características precoces e estruturas do tecido conjuntivo, o que pode ter refletido na superioridade de osteoblastos para o grupo RIP2KO nos períodos de 14 e 21 dias pós-cirurgia, visto que possivelmente o atraso na degradação do coágulo acabou acarretando um atraso em todo o reparo, e no período mencionado no qual já ocorria remodelação óssea para o grupo WT com menor quantidade de osteoblastos, os camundongos geneticamente modificados ainda possuíam alto nível dessas células em decorrência da deposição óssea mais tardia. Também foi observado que a ausência sozinha desses grupos de receptores não foi capaz de alterar a cinética do processo de reparo ósseo. Até agora, sugere-se que esses receptores de reconhecimento padrão possam participar mais ativamente no início do processo de reparo ósseo alveolar, o qual ficou claro com os resultados relacionados ao desaparecimento do coágulo sanguíneo e a permanência mais intensa das células inflamatórias.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- ✓ A ausência da proteína RIP2 não foi capaz de interferir na à ordem cronológica ou interromper por completo o reparo ósseo alveolar.

- ✓ A ausência da proteína RIP2 promoveu um aumento na densidade de volume de células inflamatórias no processo de reparo ósseo ao período de 7 dias pós extração do incisivo.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AKIRA, S. *Toll-like receptors: lessons from knockout mice*. **Biochemical Society transactions**, v. 28, n. 5, p. 551-556, 2000.
- AKIRA, Shizuo; UEMATSU, Satoshi; TAKEUCHI, Osamu. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.
- ANG, Estabelle *et al.* Proteasome inhibitors impair RANKL-Induced NF- κ B activity in osteoclast-like cells via disruption of p62, TRAF6, CYLD, and I κ B α signaling cascades. **Journal of Cellular Physiology**, v. 220, n. 2, p. 450–459, 2009.
- ASAGIRI, Masataka; TAKAYANAGI, Hiroshi. The molecular understanding of osteoclast differentiation. **Bone**, v. 40, n. 2, p. 251–264, 2007.
- BOUXSEIN, Mary L. *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468-1486, 2010.
- BURNOUF, Thierry *et al.* Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. **Blood Reviews**, v. 27, n. 2, p. 77-89, 2013.
- FRANCISCONI, Carolina Fávaro. **Caracterização morfométrica e molecular do papel da iNOS no processo de reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas e infecciosas**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2013.
- FUKATA, Masayuki; VAMADEVAN, Arunan S.; ABREU, Maria T. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. **Seminars in Immunology**, v. 21, n. 4, p. 242–253, 2009.
- KALYVAS, Demos G.; TARENIDOU, Maria. Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on osseointegration. **Journal of oral science**, v. 50, n. 3, p. 239–246, 2008.
- KOBAYASHI, Koichi *et al.* RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. **Nature**, v. 416, n. 6877, p. 194–199, 2002.
- NURDEN, Alan T. Platelets, inflammation and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 416, n. 6877, p. 194-199, 2011.
- OKAMOTO, T.; DE CAMPOS RUSSO, M. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. **Revista da Faculdade de Odontologia de Aracatuba**, v. 2, n. 2, p. 153–169, 1973.
- PERES, Juliana Alves; LAMANO, Teresa. Strategies for stimulation of new bone formation: A critical review. **Brazilian Dental Journal**, v. 22, n. 6, p. 443–448, 2011.
- ROSS, MICHAEL H.; PAWLINA, Wojciech. **Histologia: texto e atlas**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- TADA, Hiroyuki *et al.* Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 7967–7976, 2005.
- TAKAYANAGI, Hiroshi. *Inflammatory bone destruction and osteoimmunology*. **Journal of Periodontal Research**, v. 40, n. 4, p. 287-293, 2005.
- TAKAYANAGI, Hiroshi. *Osteoclast differentiation and activation*. **Clinical calcium**, v. 17, n. 4, p. 484-492, 2007.
- TAZIMA, Maria De Fatima G.S.; DE ANDRADE VICENTE, Yvone A.Morais V.;
-

MORIYA, Takachi. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina**, v. 41, n. 3, p. 255–260, 2008.

VIEIRA, Andreia Espindola. **Caracterização morfométrica e molecular do papel das citocinas pró e anti-inflamatórias no processo do reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas e infecciosas**. Tese de doutorado. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2013.

VIEIRA, Andreia Espindola *et al.* Intramembranous bone healing process subsequent to tooth extraction in mice: Micro-computed tomography, histomorphometric and molecular characterization. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, 2015.

WEIBEL, Ewald R. Stereological Principles for Morphometry in Electron Microscopic Cytology. **International Review of Cytology**, v. 26, p. 235–302, 1969.

ANEXO

ANEXO A- COMITÊ DE ÉTICA



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru



Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 007/2014

Bauru, 27 de maio de 2014.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Papel do eixo CXCL12-HMGB1-CXCR4 na modulação da resposta imune inflamatória no recrutamento de células tronco mesenquimais no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos**, de autoria de **Andressa Espindola Vieira**, sob sua orientação foi enviado ao idotar para avaliação e considerado **APROVADO** ad referendum desta Comissão, nesta data.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Luiza Antônia de Assis Teixeira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Av. Dr. Octávio Pinheiro Briscola, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
e-mail: mferreira@fob.usp.br – Fone/FAX (14) 3228-8356
<http://www.fob.usp.br>