

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**JULIANA DOS SANTOS NEVES**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTERMITENTE DE hPTH(1-34)  
NOS ESTÁGIOS INICIAIS DO REPARO ALVEOLAR APÓS  
EXODONTIA DE MOLARES DE RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP para obtenção do Título de Doutor em Biologia Buco-Dental, Área de Histologia e Embriologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristiane Ribeiro Salmon

Este exemplar corresponde à versão final da Tese defendida pelo aluno, e orientada pelo Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes

---

Assinatura do Orientador

**PIRACICABA  
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

N414e Neves, Juliana dos Santos, 1982-  
Efeito da administração intermitente de hPTH(1-34) nos  
estágios iniciais de reparo alveolar após exodontia de molares de  
ratos / Juliana dos Santos Neves. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Pedro Duarte Novaes.  
Coorientador: Cristiane Ribeiro Salmon.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Hormônio Paratireóideo. 2. Ossos – Crescimento. 3.  
Morfometria. I. Novaes, Pedro Duarte, 1960- II. Salmon, Cristiane  
Ribeiro. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Effect of intermittent administration of hPTH(1-34) on the  
early stages of alveolar wound healing after rat molar extraction

**Palavras-chave em Inglês:**

Parathyroid hormone

Bone growth

Morphometry

**Área de concentração:** Histologia e Embriologia

**Titulação:** Doutor em Biologia Buco-Dental

**Banca examinadora:**

Pedro Duarte Novaes [Orientador]

Maria Luíza Ozores Polacow

Adriana Fernandes da Silva

Karina Gonzales Silvério Ruiz

Marcelo Rocha Marques

**Data da defesa:** 28-02-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 28 de Fevereiro de 2012, considerou a candidata JULIANA DOS SANTOS NEVES aprovada.

Prof. Dr. PEDRO DUARTE NOVAES

Profa. Dra. MARIA LUIZA OZORES POLACOW

Profa. Dra. ADRIANA FERNANDES DA SILVA

Profa. Dra. KARINA GONZALES SILVÉRIO RUIZ

Prof. Dr. MARCELO ROCHA MARQUES

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, que forneceu toda infra-estrutura e meios para a realização deste trabalho e para minha formação acadêmica. Agradeço também ao Laboratório de Periodontia, na pessoa do Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior, por disponibilizar o uso do aparelho de PCR em tempo real e seus acessórios. Este curso de doutorado foi realizado com apoio financeiro da FAPESP (proc. 2008/05212-8) e da CAPES (proc. 2294-10-9). Agradeço pelas bolsas concedidas, ficando a consciência de que estes recursos foram utilizados na formação de um profissional que se qualifica a partir do estudo e principalmente da prática, suportados por estes órgãos de fomento a pesquisa. Além do apoio institucional e financeiro, pude contar com pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação profissional e pessoal. Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes, pelos anos de trabalho em conjunto, e principalmente por confiar na minha capacidade profissional, me deixando livre para realizar minhas escolhas, que independente de terem resultado em sucesso ou fracasso, fazem parte de uma experiência adquirida. A minha co-orientadora, Profa. Dra. Cristiane Ribeiro Salmon, por me impulsionar frente aos desafios, pela amizade e pela colaboração em todas as etapas da realização deste trabalho. Aos amigos e companheiros de laboratório, Eliene A. O. Narvaes, José Rosa Gomes e Nádia Fayez Omar, que com uma convivência baseada no respeito às limitações de cada um e o desejo de somar, resultou na formação de uma parceria de sucesso. Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Morfologia por dividirem experiências, pelo apoio e agradável convivência. A toda a equipe do Laboratório de Estudo dos Tecidos Calcificados e Biomateriais da Universidade de Montreal, por contribuírem para o meu amadurecimento científico. E finalmente, agradeço aos meus pais, Aldo Domingues Neves e Janice dos Santos Neves, à minha irmã, Janaína dos Santos Neves, e ao meu namorado, Henry Sako, pelo amor e apoio incondicionais.

## RESUMO

A administração intermitente do hormônio paratireóideo (PTH) promove um aumento da massa óssea, sendo atualmente utilizado no tratamento de osteoporose. Entretanto, poucos estudos têm avaliado os efeitos do PTH sobre o metabolismo do osso alveolar, e mais especificamente, no processo de reparo desta estrutura, podendo este surtir um efeito favorável na cicatrização da ferida alveolar. Considerando-se que o padrão de cicatrização da ferida do alvéolo de molares de ratos é similar ao de humanos e a sua relevância clínica, este estudo teve como objetivo analisar o efeito da administração intermitente do PTH sobre o reparo alveolar após exodontia de molares de ratos. Ratas Wistar de 200g tiveram seus primeiros molares inferiores extraídos e receberam injeções subcutâneas de 40 µg/kg de hPTH(1-34) (grupo PTH) ou solução veículo (grupo controle) em dias intermitentes após a exodontia. Os animais foram sacrificados aos 3, 5, 7 e 11 dias após a cirurgia. Análises histomorfométricas do volume de osso recém-formado, número de osteoblastos e osteoclastos TRAP-positivos foram realizadas em cortes histológicos seriados. O Ligante do receptor ativador do fator nuclear  $\kappa\beta$  (RANKL), Sialoproteína óssea (BSP) e Osteopontina (OPN) foram localizadas no alvéolo em cicatrização por imunohistoquímica. A expressão dos genes de Colágeno 1 (*Col1a1*), Fosfatase alcalina (*Alp*), Fator de crescimento insulínico (*Igf-1*), Osteocalcina (*Ocn*), *Bsp*, *Opn*, Osteoprotegerina (*Opg*) e *Rankl*, foi analisada por qRT-PCR. A presença de osso recém-formado foi notada em alvéolos a partir de 5 dias de reparo em ambos os grupos. O volume de osso recém-formado foi significativamente maior no grupo PTH nos períodos de 5, 7 e 11 dias ( $p < 0.05$ ), acompanhado de um número maior de osteoblastos aos 5 dias de reparo ( $p < 0.05$ ). No grupo controle houve um aumento gradual na expressão de todos os genes estudados, com exceção de OPN, nos períodos após a cirurgia. De um modo geral, a expressão de *Col1a1*, *Alp*, *Igf-1* e *Ocn* foi maior no grupo PTH nos períodos iniciais, seguido por um decréscimo significativo aos 7 dias de reparo comparado ao grupo controle. A expressão de *Bsp* foi similar em ambos os grupos, enquanto a expressão de *Opn* foi menor

no grupo PTH aos 7 e 11 dias de reparo, com estas proteínas apresentando a mesma distribuição nas trabéculas ósseas em formação no interior do alvéolo. O número de osteoclastos TRAP-positivos foi similar em ambos os grupos em todos os períodos avaliados, assim como o padrão de marcação para RANKL. Entretanto, a razão dos genes *Rankl:Opg* foi maior no grupo PTH aos 11 dias de reparo, sugerindo que o PTH pode favorecer a osteoclastogênese a partir deste período. Conclui-se que o tratamento intermitente com hPTH (1-34) teve um efeito anabólico sobre o processo de reparo do osso alveolar de forma pontual aos 5 dias, estimulando o aumento no número de osteoblastos e da expressão de genes relacionados a diferenciação e produção de matriz por estas células, causando conseqüentemente, um aumento no volume de osso recém-formado no interior do alvéolo.

Palavras-chave: Hormônio paratireóideo, reparo ósseo alveolar, morfometria, expressão gênica.

## ABSTRACT

The intermittent administration of parathyroid hormone (PTH) promotes an increase in bone mass, and it is currently used to treat osteoporosis. However, few studies have evaluated the effects of PTH on the metabolism of the alveolar bone, and more specifically in the repair process of this structure, which may have a positive effect on alveolar wound healing. Considering that the pattern of the alveolar wound healing post molar extraction in rats is similar to that of the humans and its clinical relevance, this study aimed to analyze the effect of intermittent PTH administration on alveolar wound healing after extraction of rat molars. Wistar rats (200g) had their first molars extracted and received subcutaneous injections of 40 µg/kg of hPTH (1-34) (PTH group) or vehicle solution (control group) in alternated days after the extraction. The animals were sacrificed at 3, 5, 7 and 11 days after surgery. Histomorphometric analysis of the volume of newly formed bone, number of osteoblasts and TRAP-positive osteoclasts were performed on serial histological sections. Receptor activator of nuclear factor  $\kappa\beta$  ligand (RANKL), bone sialoprotein (BSP) and osteopontin (OPN) were localized at the healing socket by immunohistochemistry. Collagen 1 (*Col1 $\alpha$ 1*), alkaline phosphatase (*Alp*), insulin growth factor (*Igf-1*), osteocalcin (*Ocn*), *Bsp*, *Opn*, osteoprotegerin (*Opg*) and *Rankl* gene expression was assessed by qRT-PCR. Newly formed bone was observed in sockets from 5 days of repair in both groups. The volume of newly formed bone was significantly higher in PTH group at 5, 7 and 11 days of repair ( $p < 0.05$ ). In the control group there was a gradual increase in the expression of all genes studied, except for *Opn*, through the periods of healing. Overall, the expression of *Col1 $\alpha$ 1*, *Alp*, *Igf-1* and *Ocn* in the PTH group was higher at the initial periods, followed by a significant down-regulation at 7 days of repair compared to the control group. *Bsp* expression was similar in both groups, while *Opn* expression was down-regulated by PTH at 7 and 11 days of repair. Both proteins showed the same distribution on the forming trabeculae in the socket. The number of TRAP-positive osteoclasts was similar in both groups in all periods of repair, as well as the labeling pattern for RANKL. However,

*Rankl:Opg* ratio was higher in the PTH group at 11 days of repair, suggesting that PTH may promote osteoclastogenesis from this period. In conclusion, the intermittent treatment with hPTH-(1-34) had an anabolic effect on the alveolar wound healing specifically at 5 days of repair, stimulating an increase on the osteoblast number and on the expression of genes related to the differentiation and production of bone matrix by these cells, thereby resulting in increased volume of newly formed bone in the healing socket.

Key words: Parathyroid hormone, alveolar wound healing, morphometry, gene expression.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP = Fosfatase alcalina  
BMP = Proteína morfogenética óssea  
BSA= Albumina bovina sérica  
BSP = Sialoproteína óssea  
cAMP = Adenosina cíclica monofosfatada  
COL = Colágeno  
DNA = Ácido desoxirribonucleico  
EDTA = Ácido etilenodiaminotetracético  
FDA = Food and Drugs administration  
HE = Hematoxilina e Eosina  
hPTH= Hormônio paratireóideo humano  
IGF-1= Fator de Crescimento Insulínico do tipo I  
Kg= kilograma  
mRNA = RNA mensageiro (RNA=ácido ribonucleico)  
nm = Nanômetros  
OCN= Osteocalcina  
OPG = Osteoprotegerina  
OPN = Osteopontina  
PBS= Tampão fosfato salino  
PTH = Hormônio paratireóideo, paratormônio;  
PTHrP = Peptídeo relacionado ao PTH  
PTHR1 = Receptor do PTH e PTHrP tipo 1  
RANK = Receptor ativador do fator nuclear kappa beta  
RANKL = Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa beta  
TRAP = Fosfatase ácida tartarato resistente  
 $\mu\text{g}$  = Micrograma  
 $\mu\text{L}$  = Microlitro  
 $\mu\text{m}$  = Micrômetro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1 O hormônio paratireóideo e suas implicações no tecido ósseo	3
2.2 Reparo alveolar após exodontia em rato	7
<b>3. PROPOSIÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>10</b>
4.1 Modelo experimental	10
4.2 Coleta e processamento das amostras	11
4.2.1 Histologia	11
4.2.2 <i>Real time PCR</i>	12
4.3 Análise histomorfométrica	13
4.3.1 Densidade de osso recém-formado e contagem de osteoblastos	13
4.3.2 Evidenciação e contagem de osteoclastos	15
4.3.3 Análise estatística da histomorfometria e contagem de osteoclastos	16
4.4 Reações de Imunohistoquímica	16
4.4.1 Imunoperoxidase	16
4.4.2 Imunocitoquímica com ouro coloidal	17
4.5 Reação em cadeia da polimerase em tempo real a partir da transcrição reversa (qRT-PCR)	18
4.5.1 Extração de RNA e determinação da concentração e qualidade do material	18
4.5.2 Síntese de cDNA	19
4.5.3 Reações de PCR em Tempo Real (qPCR)	19
4.5.4 Análise estatística da expressão gênica	21
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>22</b>
5.1 Análise histológica do reparo alveolar	22
5.2 Análise histomorfométrica	25
5.2.1 Densidade volumétrica de osso recém-formado	25
5.2.2 Densidade volumétrica de osteoblastos	26
5.3 TRAP e contagem de osteoclastos	26

5.4 Imunohistoquímica	30
5.4.1 Ligante do receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$ (RANKL)	30
5.4.2 Sialoproteína óssea (BSP) e Osteopontina (OPN)	32
5.5 Análise da expressão gênica por qRT-PCR	34
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>37</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>43</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>44</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>54</b>
9.1 Parecer do comitê de ética animal	54
9.2 Parecer do comitê de ética ambiental	55

## 1. INTRODUÇÃO

A ação do hormônio da paratireóide (PTH) no esqueleto tem sido o alvo de diversos estudos nos últimos anos. A administração intermitente de PTH tem um efeito anabólico no tecido ósseo, e um aumento da massa óssea por este hormônio já foi observado em várias espécies (Miller *et al.* 1997; Jilka *et al.*, 1999; Neer *et al.*, 2001). O efeito anabólico do PTH tem sido também associado com o aumento da força e resistência óssea, aumentando a resistência à fratura (Nakajima *et al.*, 2002; Komrakova *et al.*, 2010).

Embora o PTH exerça efeito anabólico em várias espécies e modelos experimentais, a sensibilidade de ossos de diferentes partes do esqueleto a este hormônio parece variar, pois tem sido mostrado que mandíbulas são menos sensíveis as ações anabólicas do PTH do que os ossos longos (Hunziker *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2009). Muito da atual informação sobre os efeitos do PTH nos ossos craniofaciais deve ser extrapolada de estudos de outros ossos. Desta forma, estudar os efeitos da administração intermitente de PTH sobre os ossos da face, especificamente no osso alveolar, iria contribuir para a compreensão dos fatores envolvidos no metabolismo desta estrutura bem como o modo de ação do PTH sobre esta. Uma vez que diversas pesquisas têm focado na capacidade do PTH de promover anabolismo ósseo em situações onde a formação óssea está desfavorecida, como em casos de osteoporose, nós optamos por realizar este estudo em ratas com estado metabólico não comprometido, servindo como um estudo de base para futuros trabalhos que desejassem avaliar o efeito do PTH em osso alveolar de ratas idosas ou ovariectomizadas.

O osso alveolar é uma parte especializada dos ossos maxilares e mandibulares que forma a estrutura de suporte primária para os dentes. A habilidade deste osso de sofrer rápida remodelação é importante para a adaptação posicional do dente, e uma vez que este não está mais presente, novo osso alveolar se forma e remodela de modo a preencher o alvéolo onde estava a raiz (Sodek & McKee, 2000). Devido às similaridades entre molares de ratos e dentes humanos, como a ausência de erupção contínua e a

presença de raízes e ligamento periodontal, alvéolos de molares de ratos têm sido utilizados como modelo de estudo em pesquisas investigando os mais variados aspectos do reparo ósseo (Devlin, 2000; Zecchin *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2007; Sato & Takeda, 2007; Hikita *et al.*, 2009; Giorgetti *et al.*, 2010).

O comprovado efeito anabólico do PTH indica que este hormônio pode favorecer processos de reparo de ossos da face. No entanto, muitas pesquisas são necessárias para avaliar o efeito do PTH em cada particularidade clínica e acima de tudo entender o mecanismo de ação desta droga. Embora o completo mecanismo pelo qual o PTH gera anabolismo ósseo não seja totalmente compreendido, acredita-se que o aumento da massa óssea provocada pela administração intermitente de PTH, pode estar relacionado à estimulação da proliferação e diferenciação de osteoblastos, bem como, uma diminuição da taxa de apoptose destas células (Swarthout *et al.*, 2002; Jilka, 2007). Além do mais, o volume ósseo depende do equilíbrio entre reabsorção e neoformação de osso (Hadjidakis & Androulakis, 2006). Desta forma, este estudo focou não só no efeito do PTH sobre a formação óssea durante a reparação do alvéolo, mas também no efeito deste em osteoblastos e osteoclastos.

Para analisar possíveis mudanças causadas pela administração intermitente de PTH no reparo alveolar, o estudo da expressão dos genes associados à formação óssea pode fornecer dados importantes. Dentre esses genes estão os de algumas proteínas da matriz óssea, colágeno tipo I, osteocalcina, sialoproteína óssea, osteopontina, bem como a fosfatase alcalina que é uma enzima diretamente associada à produção de tecido mineralizado. Como o osso alveolar é um tecido dinâmico onde eventos de remodelação ocorrem freqüentemente, faz-se necessário avaliar as mudanças na expressão de genes como osteoprotegerina e ligante do receptor ativador do fator nuclear  $\kappa\beta$ , moléculas associadas à osteoclastogênese, que têm sua expressão modulada pelo PTH, e o fator de crescimento insulínico tipo I, que pode ser um importante mecanismo pelo qual o tratamento intermitente com hPTH(1-34) pode interferir no reparo (Swarthout *et al.*, 2002).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O hormônio paratireóideo e suas implicações no tecido ósseo

O hormônio paratireóideo (PTH) é um hormônio polipeptídico de 84 aminoácidos secretado pelas glândulas paratireóides. A função geral do PTH endógeno é manter os níveis extracelulares normais de cálcio por aumentar a absorção gastrointestinal deste íon, a reabsorção nos rins de cálcio e fosfato e a reabsorção óssea osteoclástica, levando a liberação de cálcio do esqueleto (Quattrochi & Kourlas, 2004).

O PTH geralmente é considerado um agente catabólico para o esqueleto, promovendo reabsorção e perda óssea. Por exemplo, o hiperparatireoidismo primário, onde os níveis de PTH são mantidos elevados na circulação sistêmica, está associado com reabsorção óssea e osteopenia (Silva *et al.*, 2011). Entretanto, sabe-se que o PTH pode ter efeitos paradoxos no esqueleto. Contínua infusão de PTH provoca um decréscimo na massa óssea, pelo aumento da atividade osteoclástica, enquanto a administração intermitente promove um aumento da massa óssea, por estimular diferenciação de osteoblastos (Neer *et al.*, 2001; Horwitz *et al.*, 2003).

O efeito anabólico do PTH tem sido de considerável interesse nos últimos anos. A administração intermitente de PTH mostrou aumentar a densidade mineral óssea em mulheres com osteoporose (Neer *et al.*, 2001) e em ratos ovariectomizados (Andersson *et al.*, 2001), a resistência de ossos longos a fratura (Komrakova *et al.*, 2010) e acelerar o reparo de fraturas ósseas (Nakajima *et al.*, 2002). Estudos investigando o efeito de aplicações intermitentes de PTH na mandíbula mostraram que o PTH estimulou a formação óssea em mandíbulas de ratos idosos e ovariectomizados (Miller *et al.*, 1997), e foi capaz de inibir perda óssea em ratos com periodontite experimentalmente induzida, mesmo, quando a periodontite foi induzida em ratas osteoporóticas (Barros *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2005). Devido ao comprovado efeito anabólico do PTH no auxílio ao tratamento da osteoporose,

atualmente é a única droga anabólica óssea permitida para uso em humanos (Food And Drug Administration - FDA, 2000).

A principal forma biologicamente ativa do hormônio paratireóideo é a molécula intacta, o PTH(1-84). O fragmento amino-terminal (N) do hormônio, o PTH(1-34), possui atividade biológica comparável ao PTH(1-84) e pode ser gerado durante proteólise hepática da molécula intacta (Hock *et al*, 2002). *In vivo*, nenhuma diferença no osso ou em nível molecular foram mostradas entre as respostas ao hormônio humano inteiro hPTH(1-84) e o hPTH(1-34), porém, uma porção N-terminal intacta foi requerida para o PTH aumentar a densidade mineral óssea em ratas maduras ovariectomizadas (Armento-Villareal *et al*, 1997).

A resposta celular ao PTH ocorre via ativação de eventos intracelulares mediada por receptor, o PTH1R. O PTH1R é um receptor transmembrana acoplado à proteína-G, e a ligação do ligante ao PTH receptor ativam a sinalização do 2º mensageiro (Luck *et al*, 1999; Grauschopf *et al*, 2000). O AMP cíclico (cAMP) tem sido implicado como a principal via de sinalização ativada. Assim, tem sido proposto que cAMP é a via principal pela qual as respostas anabólicas do PTH são efetuadas (Civitelli *et al*, 1990). O mRNA do PTH1R é expresso em órgãos alvo do PTH, tais como, rins, osso e componentes mesenquimais dos dentes (Tsutsui *et al*, 2008).

Embora vários estudos sugiram que o PTH aumenta a formação óssea e o processo de cicatrização de fraturas, os mecanismos por trás destes efeitos não são completamente esclarecidos. O aumento da massa óssea provocada pela administração intermitente de PTH pode estar relacionado a uma estimulação da proliferação e diferenciação de osteoblastos, bem como, uma diminuição da taxa de apoptose destas células (Swarthout *et al.*, 2002; Jilka, 2007). Esses efeitos são obtidos pela exposição repetida e transitória das células ósseas ao PTH, já que o hormônio é eliminado da circulação dentro de 2-3 horas após a administração (Bracco *et al.*, 2003; Frolik *et al.*, 2003; Bellido *et al.*, 2005).

Alguns trabalhos têm mostrado um papel crítico da via de sinalização Wnt no efeito anabólico induzido pelo PTH (Bodine *et al.*, 2007; Kramer *et al.*,

2010). A via de sinalização Wnt, assim como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são críticas para a osteoblastogênese, porque elas fornecem o estímulo inicial para o comprometimento de progenitores mesenquimais em direção à linhagem osteoblástica. A expressão do gene *Sost* resulta na produção da proteína Esclerostina pelos osteócitos e esta proteína é um potente antagonista de BMPs e da via de sinalização Wnt. PTH parece reduzir a expressão de *Sost* em osteócitos, e estimular desta forma os efeitos pro-osteoblastogênicos (Bellido *et al.*, 2005).

O fator de crescimento tipo insulina (IGF) parece ser também requerido para o efeito anabólico do PTH na formação óssea. Um estudo mostrou que um anticorpo neutralizante de IGF-1 bloqueou os efeitos do PTH na síntese de colágeno em calvária de fetos de ratos cultivada e implicou IGF-1 como um mediador dos efeitos do PTH em osteoblastos (Canalis *et al.*, 1989). Em adição, camundongos knockout para IGF-1 falham em mostrar aumentada formação óssea em resposta ao PTH (Miyakoshi *et al.*, 2001).

Embora o mecanismo de ação do PTH não seja completamente entendido, sabe-se que o PTH regula a expressão gênica nos osteoblastos, apoiando a síntese de proteínas de matriz requeridas para nova formação óssea, proteínas que regulam a diferenciação de osteoclastos, e proteínas associadas com a degradação e *turnover* da matriz (Hock *et al.*, 2002; Jilka *et al.*, 2007).

Osteoblastos expressam proteínas como: osteopontina, sialoproteína óssea e colágeno tipo I, e sua expressão se apresenta de maneira precoce quando tais células são tratadas com PTH (Kondo *et al.*, 1997).

O colágeno do tipo I (Col1) é o principal componente estrutural da matriz óssea, e sua presença é um confiável indicador de células comprometidas na diferenciação de células ósseas (Huang *et al.*, 2004). *In vivo*, após uma injeção de PTH, a expressão de mRNA de colágeno I foi aumentada dentro de 6 horas e a síntese de matriz aumentou dentro de 24 horas em ratos jovens (Onyia *et al.*, 1995).

Proteínas não-colagenosas estão presentes na matriz orgânica do osso em quantidade muito menor do que o colágeno. Entre estas se destacam a

Sialoproteína óssea (BSP), Osteopontina (OPN) e Osteocalcina (OCN). Estas proteínas não-colagenosas são pensadas exercer um papel em regular a deposição de cristais de apatita na matriz colagenosa de suporte (Camarda *et al.*, 1987). Osteocalcina, produzida especificamente por osteoblastos maduros, apresenta uma distribuição mais generalizada na matriz óssea e parece estar envolvida na fixação do cálcio durante o processo de mineralização (McKee *et al.*, 1993). BSP e OPN estão co-distribuídas na matriz em linhas de cimentação e em espaços existentes entre as fibrilas de colágeno mineralizadas (Nanci, 1999). Tem sido mostrado que BSP é um potente nucleador de cristais de hidroxiapatita (Tye *et al.*, 2005; Baht *et al.*, 2008). Em contraste, OPN é um potente inibidor do crescimento do cristal de hidroxiapatita e parece mediar a adesão de células ósseas na matriz, incluindo osteoclastos (Goldberg & Hunter, 1995; Mckee & Nanci, 1996)

A fosfatase alcalina (ALP) expressa no tecido esquelético é denominada fosfatase alcalina não-específica de tecido. A expressão de ALP está associada com a estabilização da matriz e ocorre na fase de diferenciação dos osteoblastos (Huang *et al.*, 2004). Nos tecidos esqueléticos, ALP está confinada a superfície celular de osteoblastos e nas membranas de vesículas da matriz. Assim a fase inicial de deposição mineral de hidroxiapatita ocorre dentro de um microambiente protegido pelas membranas das vesículas da matriz e é seguida por uma segunda fase de propagação mineral na qual o cristal de hidroxiapatita em crescimento se projeta para a matriz (Millán, 2006). Estudos sobre o efeito do PTH na expressão de ALP são controversos, mostrando que o PTH pode regular negativamente a expressão de ALP *in vitro*, enquanto *in vivo* o PTH parece aumentar de expressão de ALP (Canalis, 1983; Nakajima *et al.*, 2002)

O tratamento com PTH intermitente pode aumentar a liberação de fatores osteogênicos aumentando a formação óssea, mas este efeito pode ser contrabalanceado por aumentada reabsorção, particularmente nos estágios finais da terapia (Jilka *et al.*, 2007). Isto pode ocorrer porque o ligante do receptor ativador do fator nuclear  $\kappa\beta$  (RANKL), produzido por osteoblastos, é necessário para a diferenciação de osteoclastos. Osteoclastos se diferenciam

quando o receptor ativador do fator nuclear  $\kappa\beta$  (RANK) presente na membrana de precursores de osteoclastos se ligam ao RANKL na membrana de osteoblastos. Porém, os osteoblastos também produzem Osteoprotegerina (OPG), que é um receptor que compete com RANK, impedindo a ligação deste ao RANKL (Boyce & Xing, 2008). Desta forma tem sido mostrado que PTH regula a expressão de RANKL e OPG em osteoblastos, e um balanço entre estas duas moléculas pode induzir ou reprimir a reabsorção óssea por osteoclastos (Aggarwal & Zavras, 2012).

## **2.2 Reparo alveolar após exodontia em ratos**

O processo de cicatrização de uma ferida de extração dental normalmente envolve coagulação, organização do coágulo sangüíneo com tecido fibroso proliferativo, formação de osso, e a maturação deste por remodelação. Uma investigação de tal cicatrização da ferida de extração pode contribuir para um melhor entendimento da cicatrização do osso mandibular após vários procedimentos cirúrgicos (Sato & Takeda, 2007). No contexto de sua relevância clínica, a extração de molares em ratos parece ser um modelo interessante para o estudo do reparo ósseo devido à ausência de formação de cartilagem e o curto período de tempo necessário para a cicatrização (Zecchin *et al*, 2007).

A seqüência de cicatrização do alvéolo após a extração dental em ratos é similar a do homem sendo, porém, mais rápida (Amler *et al.*, 1960, Devlin, 2000). Imediatamente após a exodontia, o alvéolo é preenchido por sangue, o qual se coagula e passa a ser progressivamente substituído por tecido de granulação (Guglielmotti & Cabrini, 1985). O ligamento periodontal remanescente desempenha um papel importante no início da cicatrização da ferida alveolar, uma vez que a partir deste, fibroblastos proliferam-se e iniciam a síntese de fibras colágenas (Lin *et al.*, 1994, Devlin, 2000, Sato & Takeda, 2007). Ao longo deste período inicial (cerca de três dias) ocorre a angiogênese e as células epiteliais passam a proliferar intensamente com a finalidade de recobrir a ferida (Devlin *et al.*, 1996; McMillan, 1999).

Após 4 a 5 dias, fibras colágenas do tipo I, principal componente orgânico da matriz óssea distribuem-se pelo alvéolo das paredes alveolares em direção ao centro e observa-se o início da substituição do tecido conjuntivo por tecido ósseo, com deposição de osteóide pelos osteoblastos, enquanto as cristas e septos alveolares começam a ser reabsorvidas por osteoclastos (Iizuka *et al.*, 1992; Devlin, 2000, Hikita *et al.*, 2009). Uma semana após a exodontia, o epitélio recobre quase totalmente o alvéolo e aumenta a deposição de tecido ósseo intra-alveolar (Guglielmotti & Cabrini, 1985; Devlin *et al.*, 1996). Cerca de 10 dias após a exodontia, o alvéolo está completamente recoberto por epitélio. Osso jovem está presente em todo o alvéolo, imaturo e fibrilar na região central e mais organizado nas proximidades das paredes ósseas (Devlin *et al.*, 1996; Sato & Takeda, 2007). Entre 2 e 3 semanas, ocorre união e espessamento das trabéculas ósseas recém-formadas, juntamente com diminuição dos espaços medulares e vasculares (Iizuka *et al.*, 1992; Devlin *et al.*, 1996). Após 21 dias, predominam os processos de remodelação óssea, os quais se estendem por meses após a remoção do dente, até não haver diferença estrutural entre o osso recém-formado e o osso alveolar adjacente (Smith, 1974; Guglielmotti & Cabrini, 1985).

### **3. PROPOSIÇÃO**

No intuito de analisar o efeito da administração intermitente de hPTH(1-34) no processo de reparo alveolar de molares de ratos o presente trabalho tem como objetivo avaliar o volume de osso recém-formado no alvéolo associado a presença de osteoblastos e osteoclastos, bem como analisar a expressão de genes relacionados à formação e reabsorção óssea.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

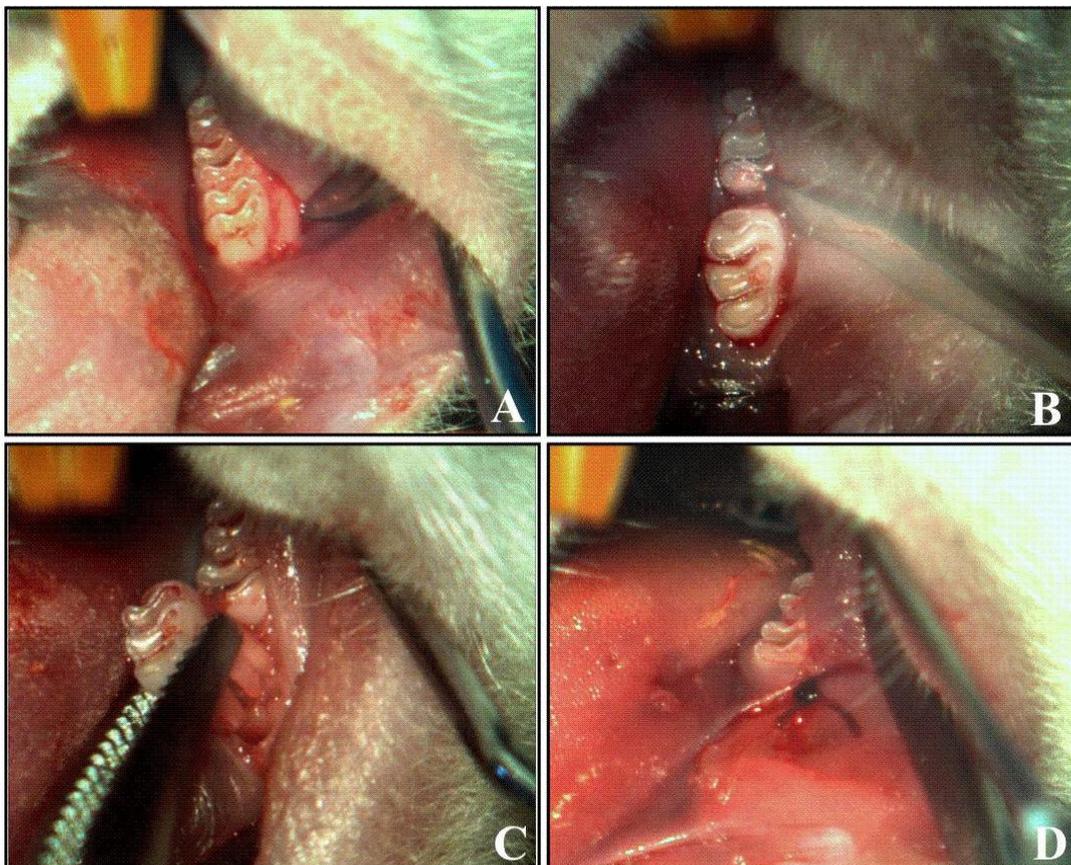
### 4.1. Modelo experimental

Para este estudo foram utilizadas 104 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), de 10 semanas de idade, com peso médio de 200 gramas. As ratas foram adquiridas do CEMIB-UNICAMP, mantidas no Biotério do Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP sob condições controladas de luz (12 horas no claro, 12 horas no escuro) e temperatura (25-30°C), e tratadas com ração balanceada padrão sólido e água *ad libitum*.

Os animais foram anestesiados com Ketamina (Dopalen, Agribands, Brasil) 80 mg/Kg de peso do animal, associado ao relaxante muscular Cloridrato de Tiazina (Rompun, Bayer, Brasil) 8 mg/Kg e os primeiros molares inferiores foram extraídos da seguinte maneira: a gengiva ao redor do primeiro molar inferior foi descolada com hollemback 3ss e o dente foi luxado utilizando-se micro-cinzel Ochenbein n°.1. Em seguida, o dente foi avulsionado com o auxílio de pinça Mosquito curva adaptada como fórceps (Fig.1). Os alvéolos foram fechados por sutura com fio de nylon monofilamentar 5.0 com agulha atraumática (Mononylon, Ethicon, Brasil).

Os animais foram separados em dois grupos experimentais: 1) grupo tratado com PTH – as ratas receberam injeções subcutâneas de 40 µg/kg de hPTH (1-34) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) preparado em ácido acético 0.01%. A escala e a dosagem do hPTH intermitente que foram utilizados neste estudo foram baseadas em estudos prévios por Barros *et al* (2003) e Marques *et al* (2005); 2) grupo controle – as ratas receberam injeções subcutâneas da solução veículo de ácido acético 0.01%. Para os animais de ambos os grupos a primeira dose da medicação ou somente veículo foi injetada após a extração dos dentes (dia 0) e as doses seguintes a cada 2 dias. Durante a primeira semana do pós-cirúrgico os animais receberam ração em pasta para reduzir o trauma pós-operatório. O experimento realizado para coleta de tecido dos alvéolos para extração do RNA total foi o mesmo descrito acima, porém o segundo molar inferior também foi extraído e o septo entre as raízes mesial e

distal dos molares foi removido utilizando-se broca carbide esférica ¼ sob irrigação com soro fisiológico 0.9%, para facilitar a curetagem dos alvéolos.



**Figura 1** – Etapas da exodontia do primeiro molar inferior. A- Descolamento da gengiva, B- Luxação do dente com micro-cinzel, C- Remoção do dente com pinça, D- Sutura.

## 4.2. Coleta e processamento das amostras

### 4.2.1. Histologia

Os animais de ambos os grupos foram sacrificados por deslocamento cervical aos 3, 5, 7 e 11 dias após exodontia (24 horas após a última injeção). Foram utilizados dez animais em cada período de tempo, sendo cinco animais para cada grupo. Após o sacrifício as mandíbulas foram removidas, separadas em hemi-mandíbulas, dissecadas e fixadas em solução de paraformaldeído 4% com glutaraldeído 0,5% por 24 horas. Após a fixação, as hemimandíbulas

foram descalcificadas em EDTA 4,13% em temperatura ambiente por cerca de 30 dias e aparadas para a delimitação da região de estudo. As amostras contendo a região dos molares foram incluídas em Paraplast de modo que foram obtidos cortes seriados de 5 µm, no sentido de mesial para distal, do alvéolo da raiz mesial do primeiro molar inferior.

Três amostras extras do grupo controle 7 dias, após a descalcificação em EDTA foram extensivamente lavadas em tampão fosfato 0.1M, pH7.4, e processadas para inclusão em resina LR White (London resin, Berkshire, UK) (Nanci *et al.*, 2004). Cortes semifinos de 1 µm de espessura foram obtidos e corados com azul de toluidina para delimitação da área de interesse (regiões contendo porções da parede do alvéolo com osso recém-formado sobre esta). Cortes ultrafinos de 80-100 nm de espessura foram feitos com uma navalha de diamante e transferidos para grades de 200-mesh cobertas com Formvar (Electron Microscopy Sciences, USA) e foram utilizadas para posterior imunocitoquímica com ouro coloidal e análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão.

#### **4.2.2. Real time PCR**

Dezesseis animais em cada período de tempo (8 controles e 8 tratados com PTH) foram sacrificados por deslocamento cervical aos 3, 5, 7 e 11 dias após a exodontia (24 horas após a última injeção) e tiveram suas mandíbulas dissecadas. A mucosa alveolar foi incisada com lâmina de bisturi número 15 e os alvéolos do primeiro e segundo molares de ambos os lados foram curetados com escavador de dentina número 5. Todo o material curetado de um animal foi acondicionado em um mesmo tubo de polipropileno. As amostras foram imediatamente congeladas em gelo seco e posteriormente armazenados a -70°C.

### 4.3. Análise histomorfométrica

#### 4.3.1. Densidade de osso recém-formado e contagem de osteoblastos

Cinco cortes histológicos semi-seriados (intervalo de 15 cortes) do alvéolo da raiz mesial do 1º molar foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Utilizando-se lente objetiva de 20x, foram estabelecidos no alvéolo 3 campos com 0.2 mm<sup>2</sup> como ilustrado na Figura 2. As imagens digitais dos 3 campos foram capturadas e através do *software* Image – Pro Plus 4.5 (Media Cybernetic Inc, USA), um retículo de 100 pontos quadriculados foi posicionado sobre cada um deles (Fig. 3). Desta maneira um total de 300 pontos foi contado em cada corte e a densidade volumétrica de osso recém-formado e osteoblastos foi representada pela média entre os 5 cortes analisados. Osteoblastos foram identificados como células basófilas, cubóides, de núcleo esférico geralmente excêntrico, localizadas na superfície das trabéculas ósseas (Fig. 4).

A determinação da densidade volumétrica de células e estruturas no alvéolo foi baseada no princípio da estereologia aplicado à histologia por Weibel (1969) no qual a densidade de volume de uma estrutura pode ser calculada através da fórmula  $P_{pi} = P_i/P$ , onde:

$P_{pi}$  = densidade de volume da estrutura de interesse no alvéolo.

$P_i$  = soma do número de pontos coincidentes sobre a estrutura de interesse.

$P$  = número total de pontos do retículo, multiplicando-se pelo número de campos examinados.

O valor resultante foi multiplicado por cem para obter a densidade volumétrica em porcentagem e multiplicado pelo volume total dos campos analisados para obter a densidade volumétrica em  $\mu\text{m}^3$ .

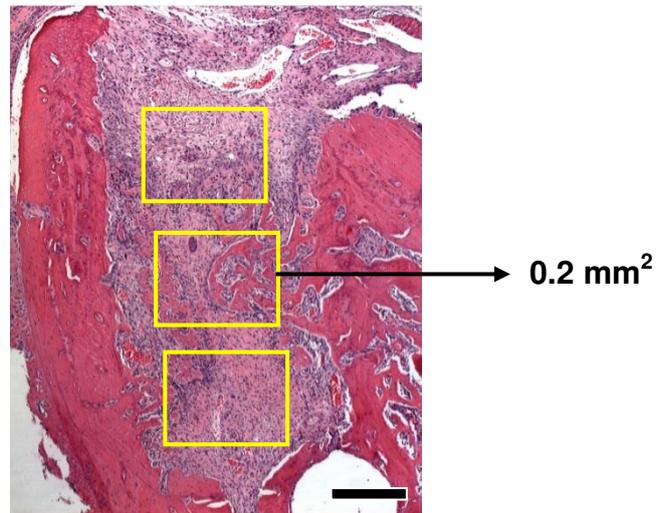


Figura 2 – Fotomicrografia de alvéolo do grupo controle aos 7 dias de reparo mostrando os campos usados para a análise histomorfométrica. Barra= 300  $\mu\text{m}$ . Hematoxilina e Eosina.

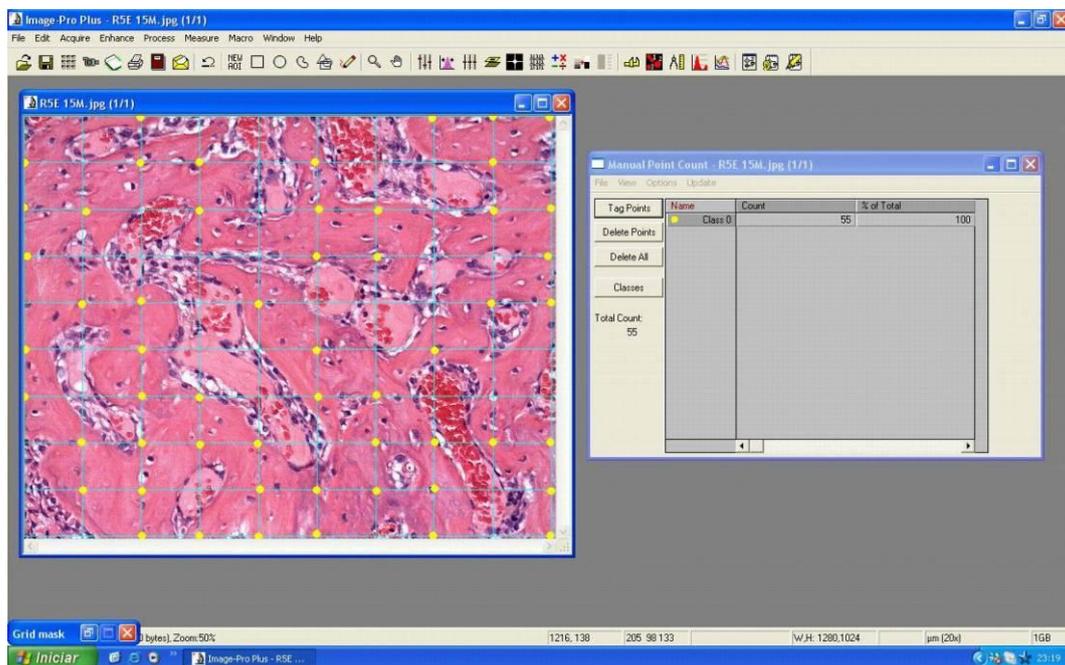


Figura 3 - Contagem de pontos sobre osso recém-formado. Através do programa Image-Pro um retículo de 100 pontos foi colocado sobre cada um dos 3 campos selecionados no alvéolo.

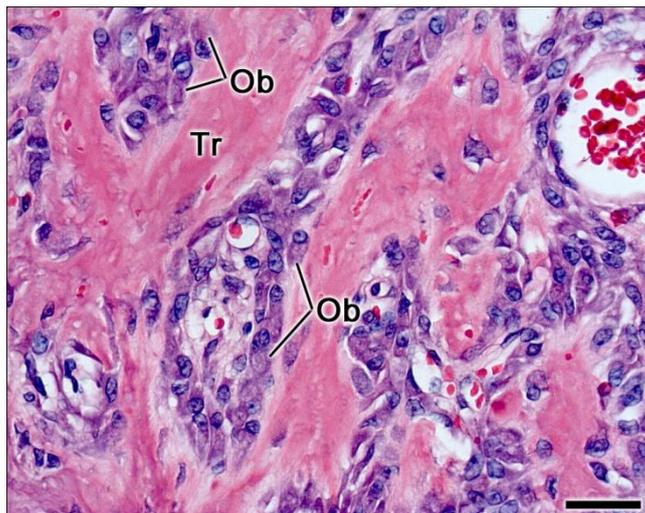


Figura 4 – Fotomicrografia de alvéolo do grupo PTH aos 5 dias de reparo. A densidade volumétrica de osteoblastos foi medida a partir de pontos coincidentes sobre estas células, reconhecidas como células basófilas, cubóides, em contato com a superfície das trabéculas ósseas. Barra= 30  $\mu$ m. Ob, osteoblastos; Tr, trabécula óssea.

#### 4.3.2. Evidenciação e contagem de osteoclastos

Para a evidenciação de osteoclastos foi utilizada a reação histoquímica da fosfatase ácida resistente ao tartarato – TRAP. Para realização deste método foram selecionados 5 cortes semi-seriados do alvéolo da raiz mesial do 1° molar inferior adjacentes àqueles corados com HE. Inicialmente foi preparada uma solução de 4 mg de naphthol AS-BI phosphate substrate (Sigma-aldrich, USA) em 0,25 mL de N,N dimetil formamida, e em seguida foram adicionados 25 mL de tampão acetato 0,2 M (pH 5,0), 35 mg de Fast RED Violet LB (Sigma-aldrich, USA) e 60  $\mu$ L de MgCl a 10%. Logo após, a solução foi filtrada, aquecida a 37°C e 50 mM de L(+) ácido tartárico (Sigma-aldrich, USA) foi adicionado. As lâminas contendo cortes dos alvéolos foram incubadas por 90 minutos a 37 °C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas por 30 minutos em água corrente, contracoradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto e montadas com lamínulas utilizando Entellan® (Merck).

Nos cortes evidenciados pelo método histoquímico de TRAP foi feita a contagem de osteoclastos TRAP-positivos. Utilizando-se uma lente objetiva de

40x, foram estabelecidos no alvéolo 7 campos de 0,05 mm<sup>2</sup> como ilustrado na Figura 5. As imagens digitais foram capturadas e as células TRAP-positivas nas proximidades do tecido ósseo (osteoclastos) foram contadas em cada um dos 7 campos. O número de osteoclastos dos 7 campos foi somado e foi feita a média dos 5 cortes analisados por alvéolo.

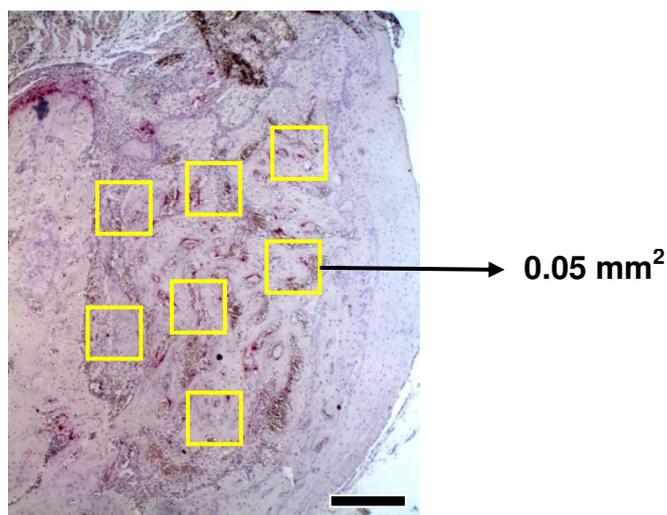


Figura 5 – Fotomicrografia de alvéolo do grupo controle aos 11 dias de reparo mostrando os sete campos utilizados para a contagem dos osteoclastos. Barra= 300 µm. Trap e Hematoxilina de Harris.

#### **4.3.3. Análise estatística da histomorfometria e contagem de osteoclastos**

As comparações entre os tempos de reparo dentro de cada grupo foram feitas usando ANOVA *one-way*, seguido por teste de Tukey. As comparações entre os grupos em cada período de tempo foram feitas utilizando teste *t* de Student não-pareado com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ ).

#### **4.4. Reações de Imunohistoquímica**

##### **4.4.1. Imunoperoxidase**

Os cortes foram desparafinizados, reidratados em uma série decrescente de soluções de etanol e lavados em água destilada. A peroxidase

endógena dos tecidos foi bloqueada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3% por 15 minutos. Para evitar marcação inespecífica, os cortes foram bloqueados com uma solução de BSA 3% em tampão fosfato salino (PBS) 0.01M, pH7.4, por 30 minutos a temperatura ambiente. Após o bloqueio, os cortes foram incubados por 3 horas a temperatura ambiente com anticorpos primários diluídos em BSA 1% em PBS nas seguintes concentrações: RANKL – 1:150 (SC-7628, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), BSP- 1:1500 e OPN – 1:2000 (LF-87 e LF-175, respectivamente, ambos anticorpos fornecidos pelo laboratório do Dr. L.W. Fisher, NIDCR, NIH, Bethesda, MD). Em seguida, os cortes foram tratados com as soluções do kit de amplificação LSAB-HRP (Dako Cytomation, Dinamarca) como recomendado pelo fabricante e revelados com uma solução de 3,3 diaminobenzidina (Sigma aldrich, USA). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris (RANKL) ou methyl Green 0.5% (BSP e OPN). A omissão do anticorpo primário foi usada como controle negativo das reações. Os cortes foram analisados em microscópio de luz (Leica DMLP, Leica Microsystems, Alemanha) acoplado a uma câmera de vídeo (DFC 280, Leica Microsystems, Alemanha).

#### **4.4.2. Imunocitoquímica com ouro coloidal**

Cortes ultrafinos de 80-100 nm foram colocados sobre uma solução de Ovalbumina 1% (Sigma Aldrich, USA) em PBS 0.01M por 15 minutos para o bloqueio de marcação inespecífica, e em seguida foram incubados com anticorpos anti-BSP (1:50) e anti-OPN (1:100) por 1 hora (LF-87 e LF-175, respectivamente, ambos anticorpos fornecidos pelo laboratório do Dr. L.W. Fisher, NIDCR, NIH, Bethesda, MD). Seguinte à incubação com os anticorpos primários, as grades contendo os cortes foram colocadas novamente na solução de bloqueio por 15 min e depois incubadas com um complexo proteína A-ouro (preparado como descrito por Bendayan, 1995) para revelar os locais de ligação do anticorpo. Todos os passos foram realizados a temperatura ambiente. Os controles negativos consistiram de cortes incubados apenas com o complexo proteína A-ouro. Finalmente, as grades foram lavadas em PBS,

seguidas por água destilada, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai 12 (Eindhoven, Holanda).

#### **4.5. Reação em cadeia da polimerase em tempo real a partir da transcrição reversa (qRT-PCR)**

##### **4.5.1. Extração de RNA e determinação da concentração e qualidade do material**

Para a extração do RNA total foi utilizado o reagente TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram ressuspensas em água tratada com DEPC (Invitrogen, USA) e os tubos contendo as amostras foram armazenados a -70°C. Cuidados extras no tratamento do material utilizado foram tomados para a manutenção de um ambiente livre de RNase.

Para determinar a concentração e pureza do material foi realizada a leitura da densidade óptica das amostras de RNA total em espectrofotômetro (NanoDrop 2000c, ThermoScientific), para os comprimentos de onda de 260 e 280 nm. O RNA foi considerado puro quando a razão entre as duas leituras ficou igual ou próxima de 1.8. Para a verificação da qualidade dos RNAs obtidos, 1µg de cada amostra foi separada em um gel de agarose a 1,2%. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado através do programa Image Máster VDS (Pharmacia Biotech, Israel). A qualidade do material foi determinada pela presença das bandas do RNA ribossômico 28S e 18S (Fig. 6).

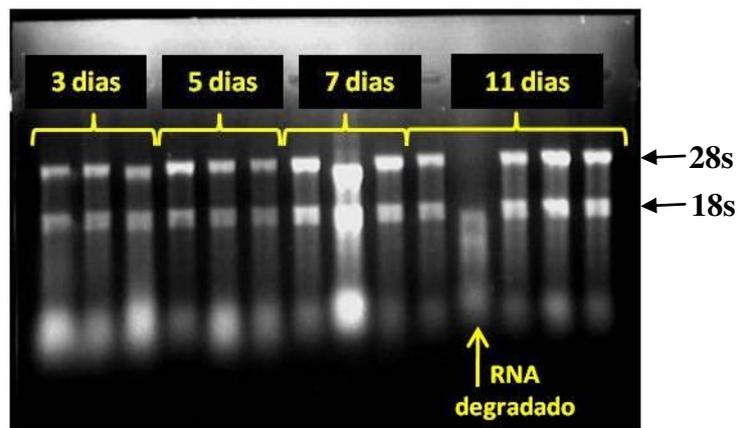


Figura 6 – Gel de agarose corado com brometo de etídeo. Em cada canaleta foram aplicados 10  $\mu$ l de solução contendo 1  $\mu$ g de RNA total de amostras do grupo PTH nos diversos períodos estudados. As bandas 28s e 18s representam RNA ribossômico.

#### 4.5.2. Síntese de cDNA

As amostras de RNA extraídas, com comprovada qualidade e pureza, foram tratadas com DNase I (Invitrogen, USA; 1 U/ $\mu$ g) por 15 minutos em temperatura ambiente, para eliminar possíveis traços de DNA genômico contaminante. A síntese de cDNA foi feita a partir de 0,1  $\mu$ g de RNA total de cada amostra, utilizando-se o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen, USA), seguindo as instruções do fabricante. Para a síntese de cDNA, a transcrição reversa foi feita utilizando-se Random Hexamers primer.

#### 4.5.3. Reações de PCR em Tempo Real (qPCR)

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema LightCycler® (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Para amplificação foram utilizados o kit de amplificação LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostic Co, USA), como recomendado pelo fabricante, e os pares de primers específicos para cada gene de interesse. Os primers foram desenhados com o auxílio de *softwares online* de acesso livre - BioEdit, Primer3 e NetPrimer e estão listados na Tabela 1. Inicialmente, as reações de

qPCR foram otimizadas testando-se diferentes concentrações dos primers e as condições de amplificação. A especificidade dos primers foi verificada por meio do pico de *Melting* como ilustrado na Figura 7.

O produto das reações foi quantificado pelo programa LightCycler Relative Quantification Software (Roche Diagnostics GmbH, Germany) utilizando-se uma ferramenta de quantificação relativa ( $2^{-\Delta C_p}$ ). O GAPDH foi utilizado como gene de referência para a normalização dos valores.

Tabela 1 – Sequência de *primers* e condições da reação para cada gene.

Gene	Sequências (5'-3')	Perfil de amplificação (°C/s)	Pares de base
Col1α1	F- CGAGTATGGAAGCGAAGGTT R- GCGTGCTGTAGGTGAATC	40 ciclos – 95/0; 55/2; 72/10	224
ALP	F- TGGACCTCATCAGCATTTGG R- TCAGTCAGGTTGTTCCGATT	40 ciclos – 95/0; 55/2; 72/7	169
IGF-1	F- GGTGTTGTAGACATTCGGTTG R- TAGATTCTGTGAAGGAAGCGG	40 ciclos – 95/0; 55/2; 72/6	150
OCN	F- ATCTATGGCACCACCGTTT R- CCGTTCCTCATCTGGACTTTAT	40 ciclos – 95/0; 55/2; 72/7	158
BSP	F- TCCTTTATCACACCCCTACC R- GACCCACACTCATTCCAACA	40 ciclos – 95/0; 55/5; 72/7	162
OPN	F- AAAGAAGAGGCAAACACAG R- GCACAGAAAGAACAGAAGCAAA	40 ciclos – 95/0; 55/5; 72/9	221
OPG	F- GCTAAATCTCAACCCCTGA R- ACTACCATAACCTACCCCTGCTT	40 ciclos – 95/0; 55/5; 72/8	202
RANKL	F- AGCGTTCTCAGGAGTT R- TACCAAGAGGACAGACTGACTTTA	40 ciclos – 95/0; 55/5; 72/6	151
GAPDH	F- GGTGATGCTGGTGCTGAGT R- AGTCTTCTGAGTGGCAGTGATG	35 ciclos - 95/0; 55/2; 72/12	300

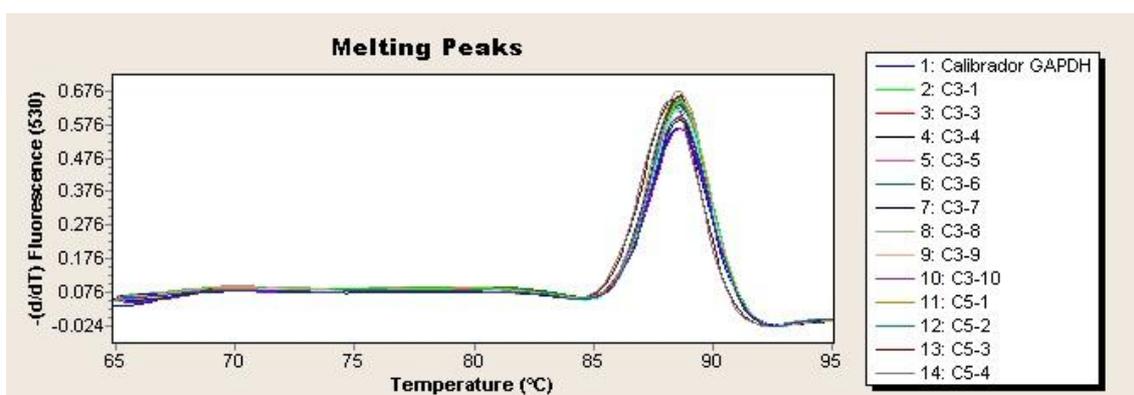


Figura 7 – Picos de *melting* gerados da reação de PCR em tempo real de algumas amostras, para o gene de referência GAPDH. A formação de um único pico para cada amostra evidencia a especificidade da reação.

#### **4.5.4. Análise estatística da expressão gênica**

Comparações entre os tempos de reparo dentro de cada grupo foram feitas usando Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. Comparações entre os grupos em cada período de tempo foram feitas utilizando o teste de Mann-Whitney não-pareado com nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise histológica do reparo alveolar

O alvéolo da raiz mesial dos primeiros molares inferiores apresentou um padrão gradual de cicatrização durante os períodos estudados. No período inicial de 3 dias de reparo, observou-se a presença de um coágulo sanguíneo e remanescentes do ligamento periodontal nas paredes do alvéolo. No tecido de granulação em formação foram observados fibroblastos, células inflamatórias e capilares sanguíneos dispersos (Fig. 8A). A presença de osso recém-formado foi observada em alvéolos a partir de 5 dias de reparo, apresentando trabéculas finas circundadas por osteoblastos globosos característicos de células em estado de síntese protéica (Fig. 8B). A formação das trabéculas ósseas se deu em meio ao tecido ainda em organização e hemácias e porções de tecido conjuntivo estavam frequentemente aprisionados na matriz óssea recém-depositada. Aos 7 dias de cicatrização o alvéolo estava preenchido por tecido conjuntivo frouxo e trabéculas ósseas mais espessas associadas a osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. (Fig. 8C). Aos 11 dias de reparo o alvéolo apresentava-se quase totalmente preenchido por trabéculas ósseas espessas contendo diversos osteócitos. Estas trabéculas delimitavam áreas de medula óssea em formação próximas de vasos sanguíneos (Fig. 8D).

A reparação do alvéolo apresentou um perfil de cicatrização das bordas em direção ao interior deste. Esse padrão de cicatrização pôde ser observado nos cortes seriados, onde os cortes feitos a região central do alvéolo apresentavam predominância de osso recém-formado próximo às paredes do alvéolo, enquanto no centro observava-se o tecido conjuntivo (Fig. 9, A-D). Mesmo em alvéolos com 3 dias de reparo, que não apresentaram osso recém-formado, foi possível observar uma substituição do coágulo por tecido conjuntivo das bordas em direção ao centro (Fig. 9 A, E). No entanto, apesar da organização do tecido predominar próximo às paredes do alvéolo, aglomerados de células em diferenciação foram frequentemente observados na região central deste, mostrando que todo o alvéolo está envolvido na

osteogênese (Fig. 10). No geral, o padrão de reparação do alvéolo no grupo controle e PTH foram similares (Fig 9, E-F).

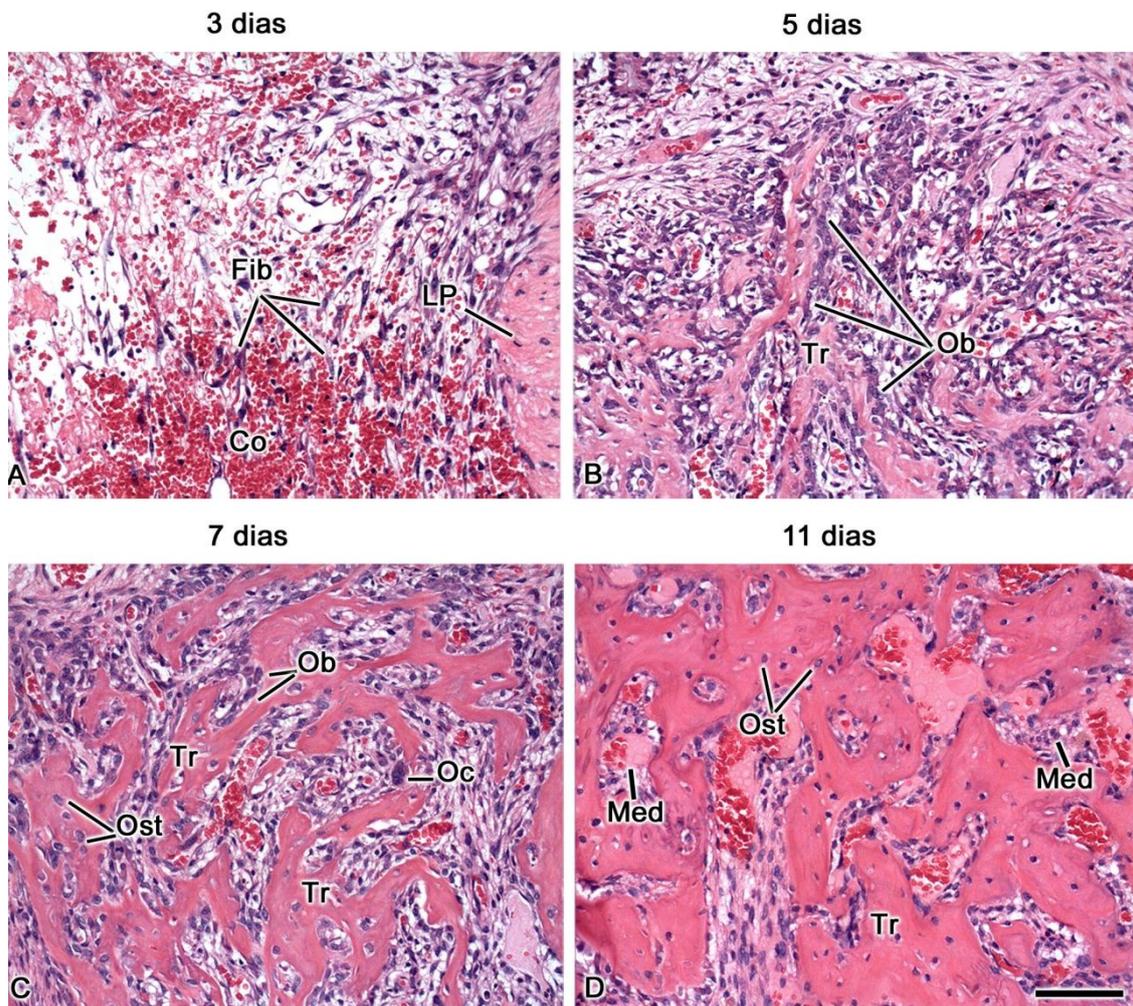


Figura 8 – Fotomicrografias de alvéolos do grupo controle aos 3, 5, 7 e 11 dias de reparo. Observar a substituição gradual do coágulo sanguíneo por tecido conjuntivo e ósseo. Co, coágulo; LP, ligamento periodontal remanescente; Fib, fibroblastos; Ob, osteoblastos; Oc, osteoclasto; Ost, osteócito; Tr, trabécula óssea; Med, medula óssea. Hematoxilina e Eosina. Barra= 80  $\mu$ m.

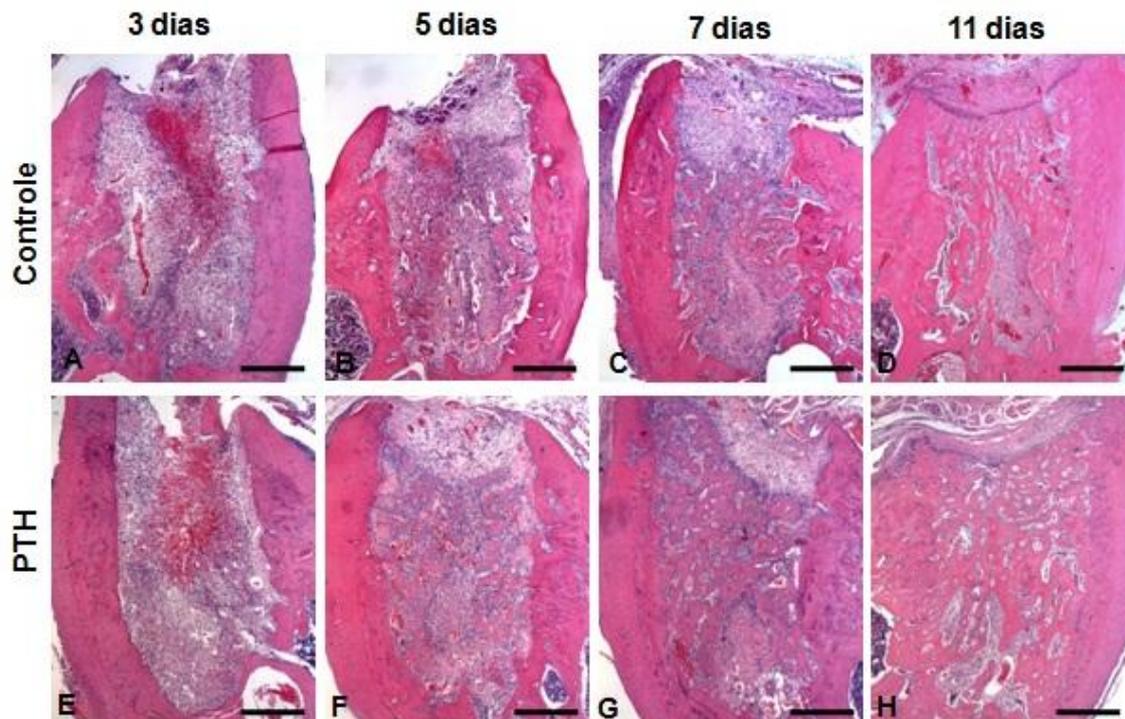


Figura 9 – Fotomicrografias de cortes próximos da região central do alvéolo da raiz mesial de primeiros molares inferiores nos grupos Controle e PTH. Observar o padrão de cicatrização das bordas para o centro do alvéolo. Barra (A-H)= 400  $\mu$ m. Hematoxilina e Eosina.

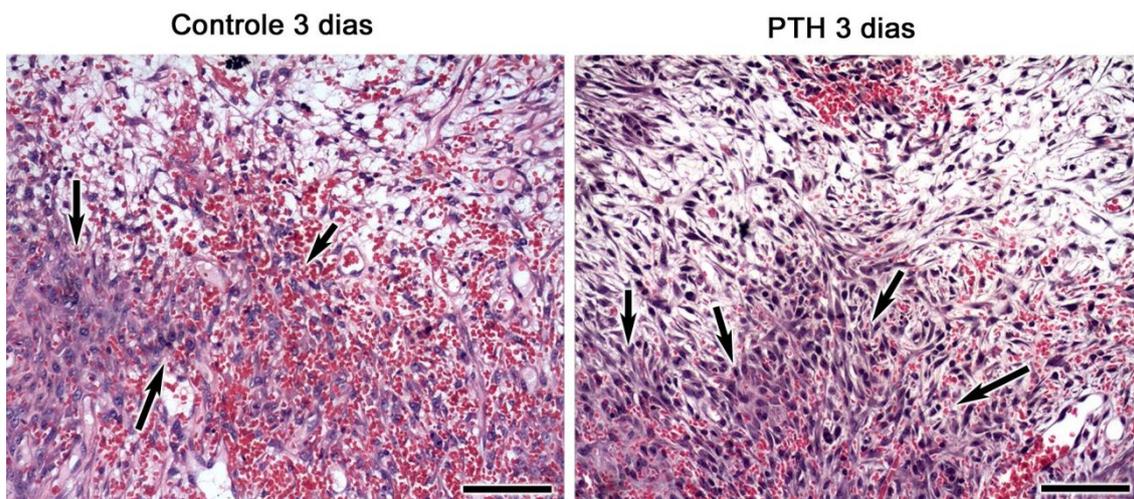


Figura 10 – Fotomicrografias de alvéolos aos 3 dias de reparo nos grupos Controle e PTH.  $\mu$ m. As setas apontam para aglomerações de células em diferenciação no interior do alvéolo. Hematoxilina e Eosina. Barra= 80  $\mu$ m.

## 5.2 Análise histomorfométrica

### 5.2.1 Densidade volumétrica de osso recém-formado

A presença de osso recém-formado no interior do alvéolo foi notada somente após o período de 5 dias de cicatrização e um aumento gradual da quantidade de osso dentro do alvéolo ocorreu durante o tempo de reparo estudado, tanto no grupo controle quanto no grupo PTH. A partir do quinto dia, o grupo tratado com PTH apresentou uma quantidade de osso recém-formado significativamente maior do que o grupo controle em todos os períodos analisados ( $p < 0.05$ , Tab.2). A diferença de volume de osso recém-formado entre os grupos Controle e PTH foi de 6.6% (5 dias), 9.5% (7 dias) e 5.2% (11 dias) (Fig.11).

**Tabela 2** – Volume de osso recém-formado no alvéolo em  $\mu\text{m}^3$ . Letras diferentes representam médias diferentes dentro do mesmo grupo.

	Controle	PTH	<i>p</i>
<b>5 dias</b>	339.1 $\pm$ 96.8 <sup>A</sup>	550.5 $\pm$ 144.6 <sup>a</sup>	0.017
<b>7 dias</b>	662.9 $\pm$ 97.6 <sup>B</sup>	954.5 $\pm$ 131.3 <sup>b</sup>	0.0008
<b>11 dias</b>	1353.7 $\pm$ 110 <sup>C</sup>	1513.9 $\pm$ 116.8 <sup>c</sup>	0.011

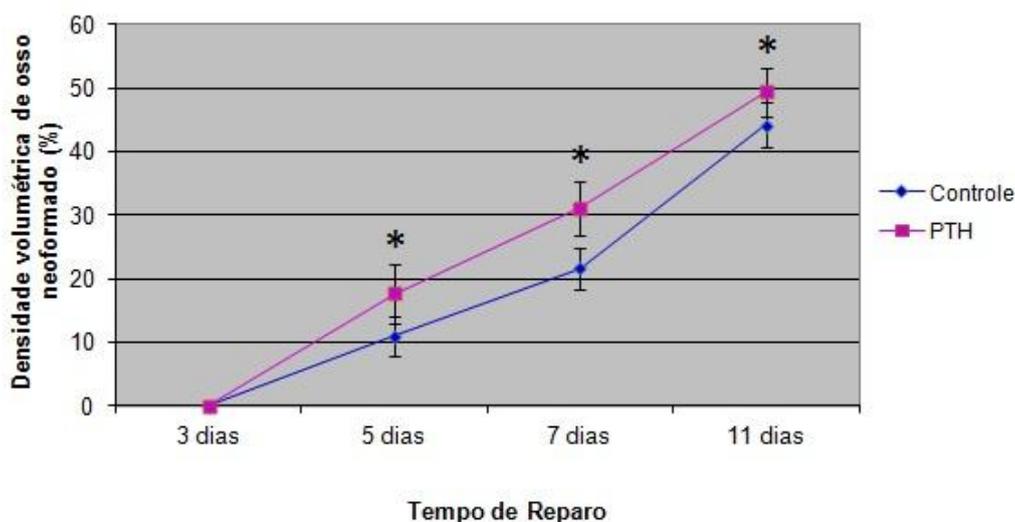


Figura 11 – Gráfico apresentando a média  $\pm$  desvio padrão da análise da densidade volumétrica de osso recém-formado durante os períodos de reparo alveolar. \* Diferença significativa entre os grupos controle e tratado com PTH ( $p < 0.05$ ).

### 5.2.2 Densidade volumétrica de osteoblastos

No grupo controle não houve diferença significativa na densidade volumétrica de osteoblastos com relação aos períodos de tempo estudados. No grupo PTH a densidade volumétrica de osteoblastos no alvéolo diminuiu durante os períodos de reparo sendo significativamente menor aos 11 dias. A análise intergrupos demonstrou que a quantidade de osteoblastos foi significativamente maior no grupo PTH aos 5 dias de reparo ( $p=0.013$ ), enquanto aos 7 e 11 dias de reparo não houve diferença na quantidade de osteoblastos entre os grupos controle e PTH ( $p=0.21$  e  $p=0.46$ , respectivamente) (Fig.12).

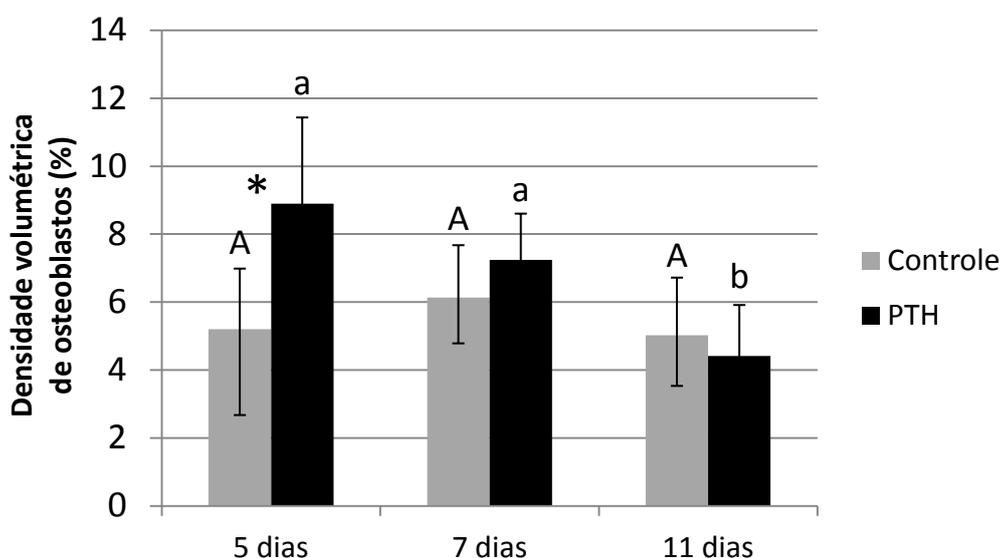


Figura 12 – Gráfico mostrando média  $\pm$  desvio padrão da densidade volumétrica de osteoblastos nos grupos Controle e PTH aos 5, 7 e 11 dias de reparo. (\*) Diferença significativa entre os grupos ( $p<0.05$ ). Letras diferentes representam médias diferentes dentro do mesmo grupo ( $p<0.05$ ).

### 5.3 TRAP e Contagem de osteoclastos

No terceiro dia após a extração dos primeiros molares inferiores, osteoclastos foram observados exclusivamente sobre a parede do alvéolo, uma

vez que o interior deste estava preenchido por tecido de granulação (Fig.13 A, B). Aos 5 e 7 dias de reparo alveolar, quando já se identifica a formação de matriz óssea, os osteoclastos foram observados adjacentes ao osso recém-formado na parede do alvéolo e sobre algumas trabéculas ósseas na região mais central do alvéolo (Fig.13 C-F). Aos 11 dias, osteoclastos estavam presentes por todo o alvéolo e se apresentavam bem evidenciados pelo corante vermelho, indicando intensa atividade da fosfatase ácida (Fig.13 E, F). O padrão de distribuição dos osteoclastos foi similar nos grupos Controle e PTH (Fig.14).

Os resultados da contagem de células mostraram que a partir do 5º dia de reparo a quantidade de osteoclastos Trap-positivos foi crescente tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com PTH ( $p < 0.05$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e PTH em cada período de tempo estudado ( $p > 0.05$ ) (Fig.15).

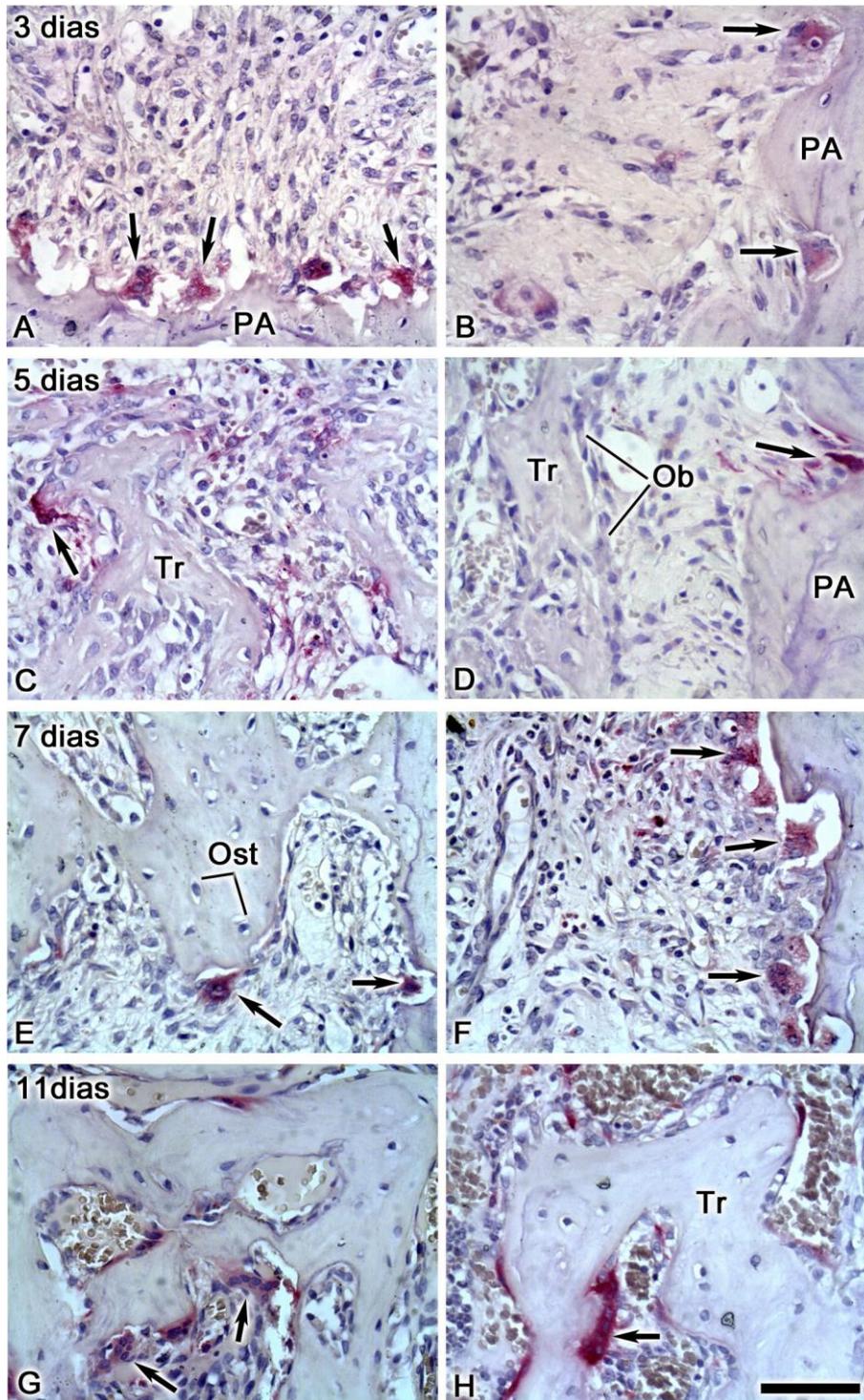


Figura 13 – Fotomicrografias de alvéolos do grupo controle nos diversos períodos de reparo mostrando a distribuição de osteoclastos Trap-positivos (setas). Barra= 60  $\mu$ m. Ob, osteoblastos; Ost, osteócitos; PA, parede do alvéolo; Tr, trabécula óssea. Hematoxilina de Harris.

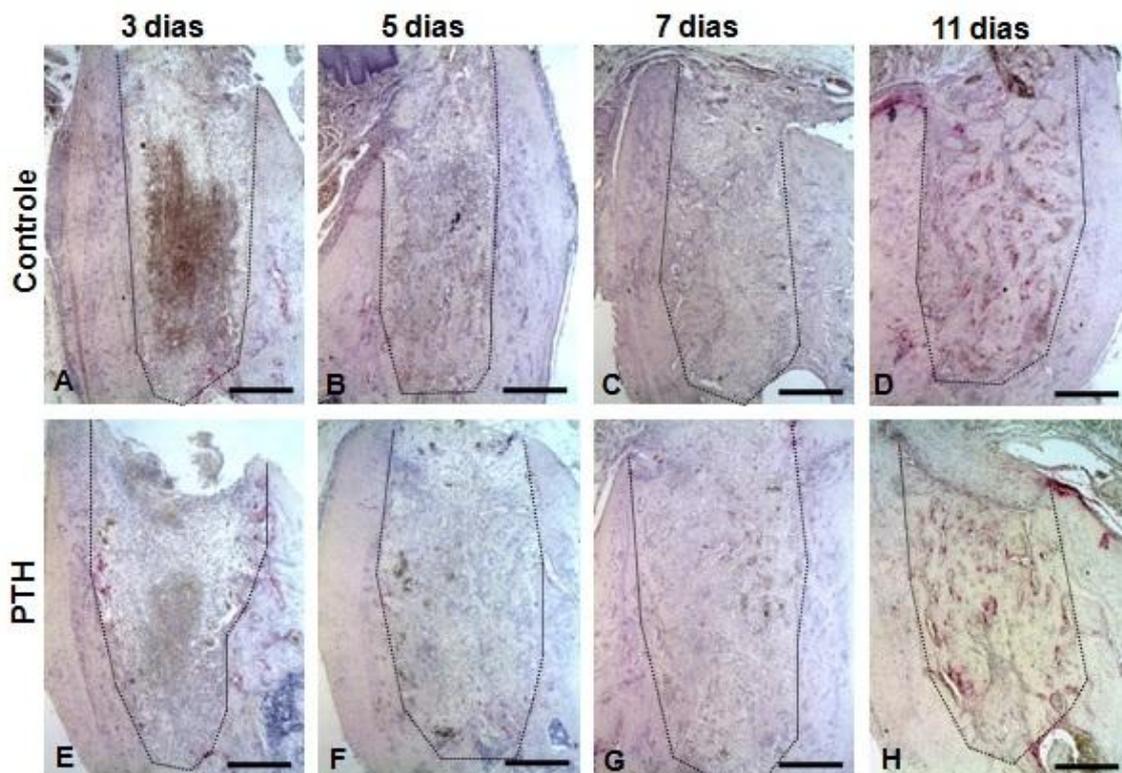


Figura 14 - Reação de TRAP em cortes de alvéolos de ratos dos grupos Controle e PTH nos períodos estudados. A linha pontilhada delimita as bordas do alvéolo. Barra (A-H)= 400  $\mu$ m. Hematoxilina de Harris.

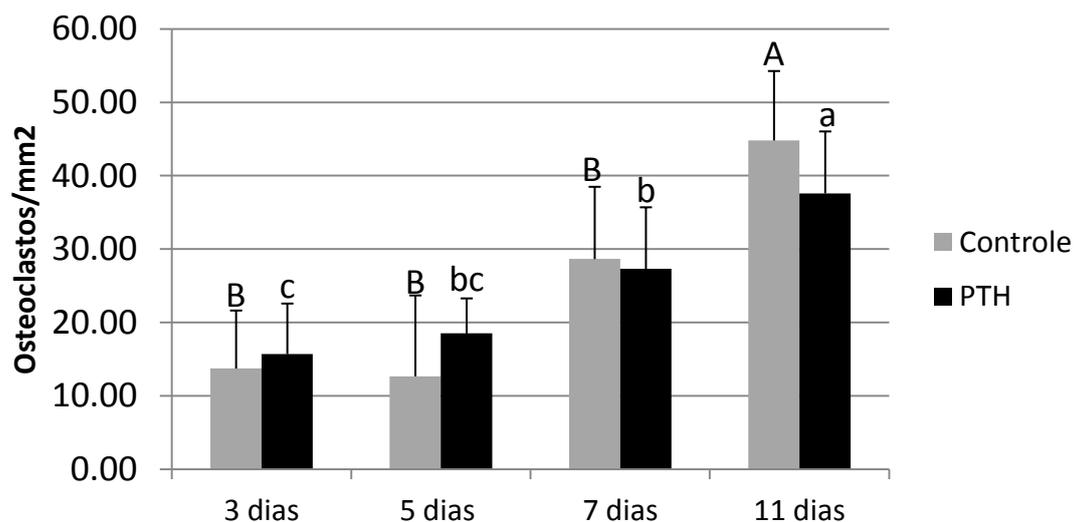


Figura 15 – Gráfico da média e desvio padrão da contagem de osteoclastos Trap-positivos nos diversos períodos de reparo. Letras diferentes representam médias com diferença significante ( $p < 0.05$ ).

## 5.4 Imunohistoquímica

### 5.4.1 Ligante do receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$ (RANKL)

RANKL foi imunolocalizada em osteoblastos, osteócitos, fibroblastos, na medula óssea e algumas vezes em osteoclastos. No terceiro dia após a exodontia, os alvéolos apresentaram-se bastante corados por DAB devido à presença do coágulo ainda existente neste período (Fig. 16 A, B). Nas regiões do alvéolo onde o tecido conjuntivo se apresentava mais organizado, observou-se que os fibroblastos apresentavam marcação para RANKL geralmente próxima ao núcleo (Fig. 16C). Aos 5 dias de reparo (Fig. 16D), os osteoblastos localizados próximos ou sobre a parede do alvéolo estavam fortemente marcados para RANKL (Fig. 16E, setas), enquanto os osteoblastos que estavam secretando a matriz óssea no centro do alvéolo apresentavam-se com marcação moderada (Fig. 16F). Assim como no terceiro dia de reparo, os fibroblastos continuavam apresentando marcação para RANKL próxima ao núcleo (Fig. 16E). Não foi observada marcação para RANKL na matriz óssea (Fig. 16, D-L). Aos 7 dias, a marcação em osteoblastos apresentou-se evidente em todas as regiões do alvéolo (Fig. 16 H, I). Também neste período observou-se a presença de alguns osteócitos marcados para RANKL (Fig. 16 H, I). No 11º dia após a exodontia, as regiões medulares que se formaram com a presença das trabéculas ósseas apresentaram-se evidentemente marcadas para RANKL, assim como os osteoblastos (Fig. 16 J, K). Osteócitos, presentes em maior quantidade, mostravam-se frequentemente marcados e nos locais onde não havia osso formado observou-se marcação difusa para RANKL no tecido conjuntivo (Fig. 16L). Nenhuma marcação foi observada em cortes de controle negativo (Fig. 17). Os alvéolos de ratos tratados com PTH apresentaram perfil de marcação para RANKL similar aos do grupo controle.

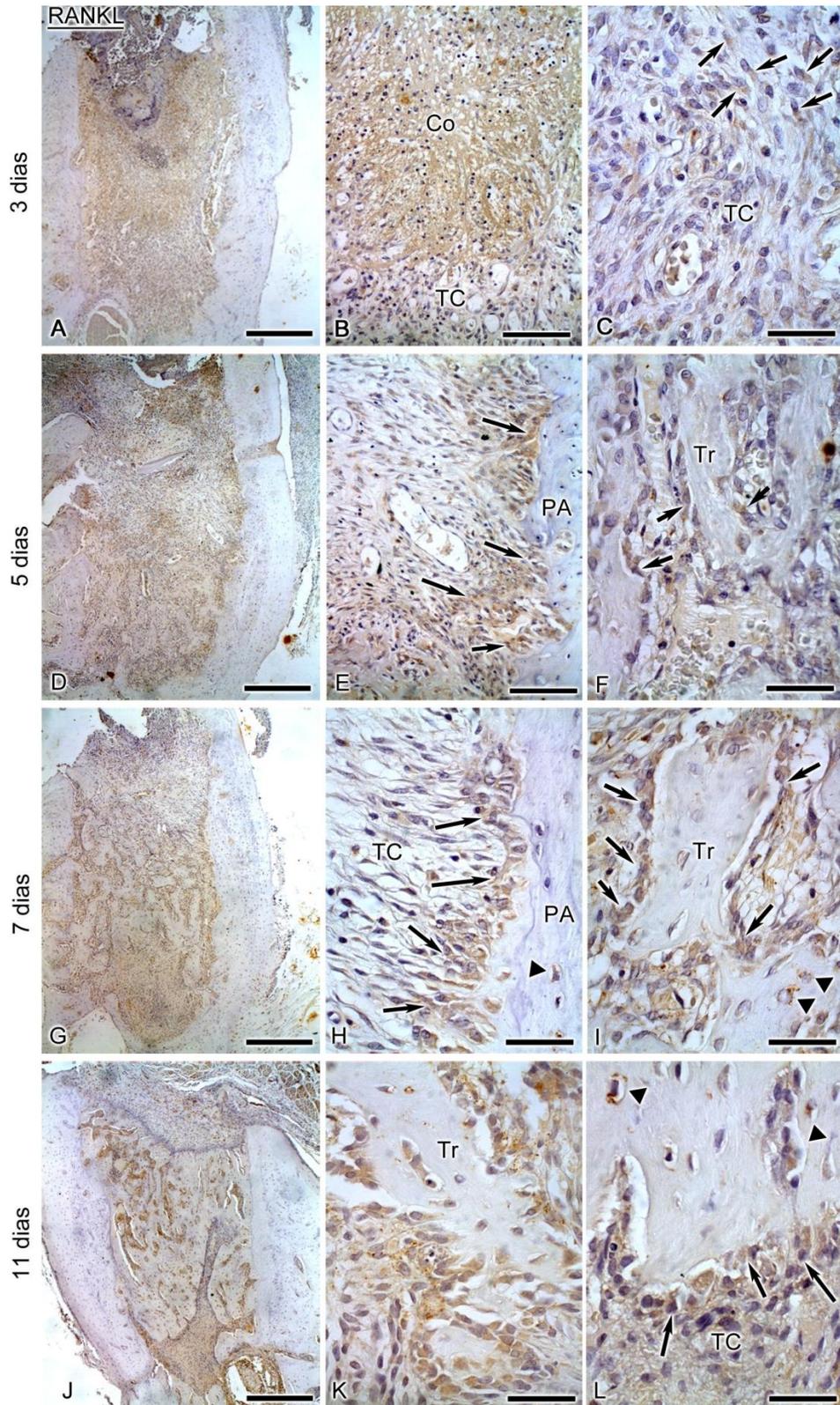


Figura 16 – Imunolocalização de RANKL em alvéolos do grupo controle aos 3 (A-C), 5 (D-F), 7 (G-I) e 11 (J-L) dias de reparo. Co, coágulo; PA, parede do alvéolo; TC, tecido conjuntivo frouxo; Tr, trabécula óssea. Fibroblastos e osteoblastos (setas). Osteócitos (cabeças de setas). Barra: (A, D, G, J)= 400 µm; (B, E)= 80 µm; (C, F, H, I, K, L)= 40 µm. Hematoxilina de Harris.

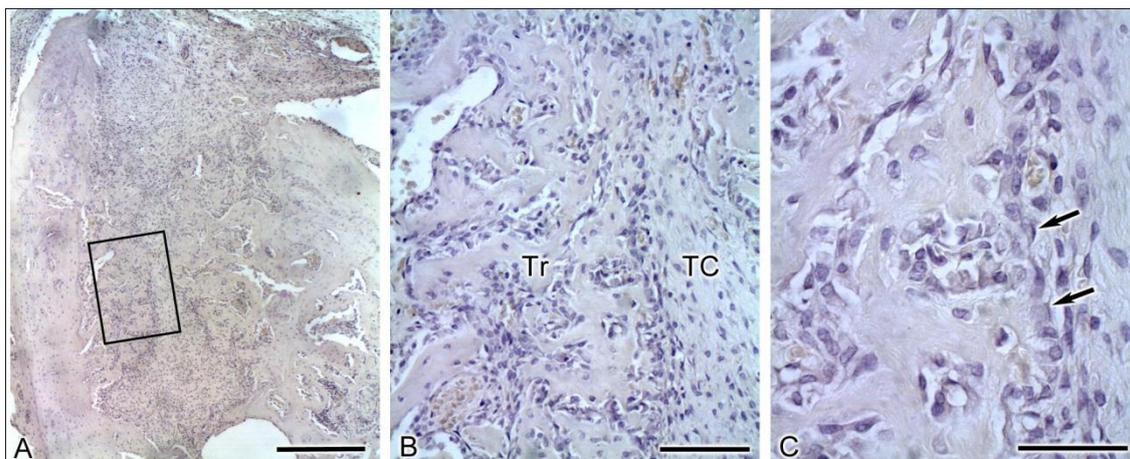


Figura 17 – Controle negativo da imunohistoquímica de RANKL em alvéolo do grupo controle aos 7 dias de reparo. Barra: (A)= 400  $\mu$ m, (B)= 100  $\mu$ m, (C)= 50  $\mu$ m. Setas, osteoblastos; TC, tecido conjuntivo frouxo; Tr, trabécula óssea. Hematoxilina de Harris.

#### 5.4.2 Sialoproteína óssea (BSP) e Osteopontina (OPN)

Cortes de alvéolos do grupo controle, aos 7 dias de reparo, foram incubados com anticorpos para BSP e OPN no intuito de imunolocalizar estas proteínas não-colagenosas de matriz no osso recém-formado no alvéolo. Pôde se observar que ambas as proteínas co-localizam nas trabéculas ósseas em formação (Fig.18 A, B). A marcação se apresenta como grânulos distribuídos na matriz óssea e estas proteínas se acumulam em linhas de cimentação entre osso recém-formado e o osso pré-existente da parede do alvéolo, como mostrado em maior aumento para BSP (Fig.18 C), porém não estão presentes no osteóide (Fig.18 D, BSP). Nas trabéculas jovens em formação no interior do alvéolo, estas proteínas estão presentes acumuladas entre as fibras colágenas da matriz óssea, como mostrado para BSP (Fig.18, E, F).

BSP e OPN foram imunolocalizadas exclusivamente na matriz óssea. Estas proteínas não-colagenosas da matriz são secretadas por osteoblastos, porém os anticorpos utilizados neste estudo detectam apenas as proteínas acumuladas na matriz extracelular, sendo as quantidades destas presentes no citoplasma dos osteoblastos algo abaixo do limite detectável por imunohistoquímica em tecidos convencionalmente processados (Nanci, 1999).

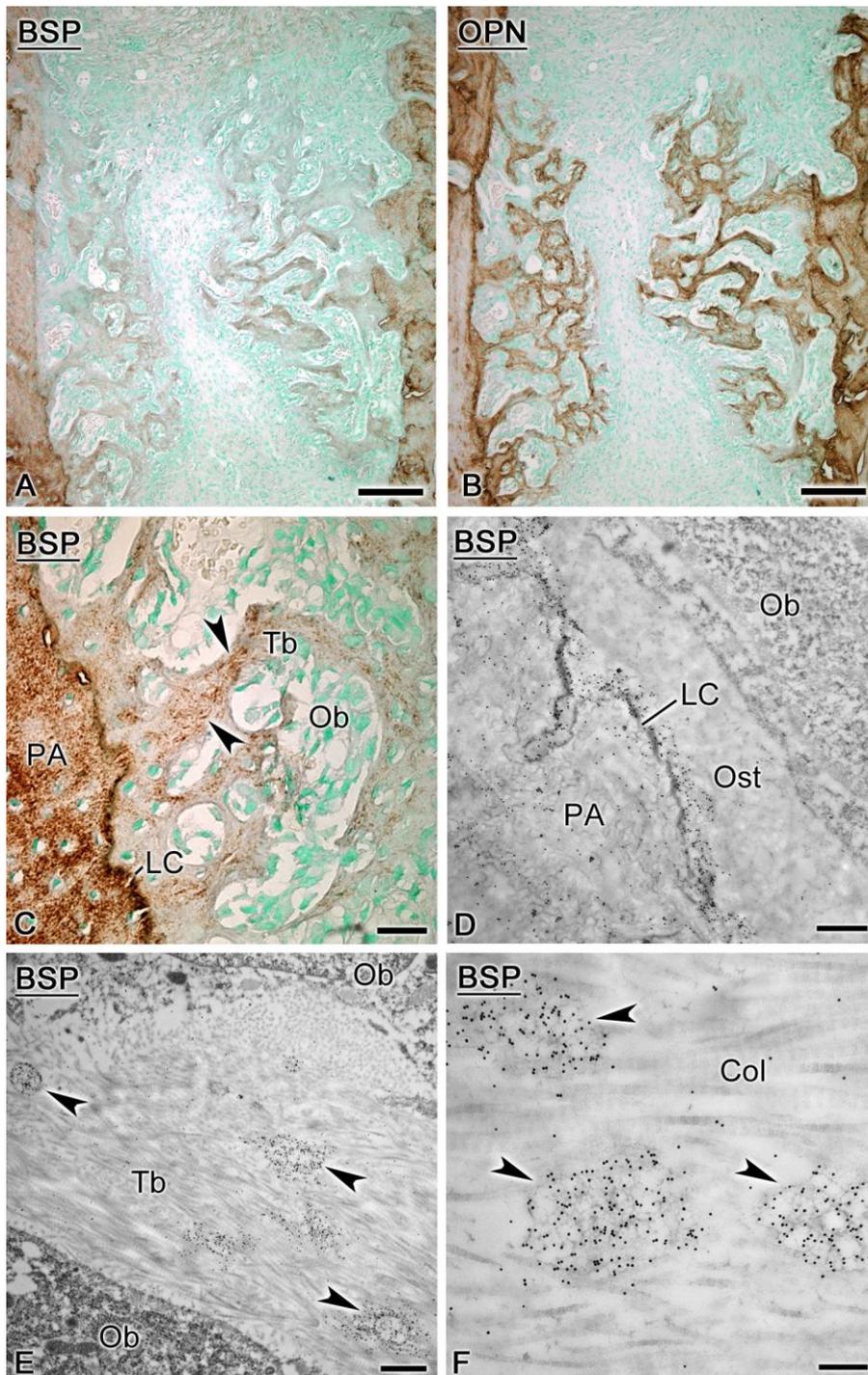


Figura 18 – Imunolocalização de BSP e OPN em alvéolos do grupo controle 7 dias. Estas proteínas não-colagenosas apresentam a mesma distribuição na matriz óssea (A, B). Detalhes da marcação e distribuição destas proteínas no alvéolo estão representados por BSP (C-D), mostrando que estas proteínas se acumulam em linhas de cimentação e em grupos entre as fibrilas de colágeno (cabeças de seta). Ob, osteoblasto; Col, fibras colágenas; LC, linha de cimentação; PA, parede do alvéolo; Tb, trabécula óssea. Barra: (A, B)= 160  $\mu$ m; (C)= 30  $\mu$ m; (D, E)= 500 nm; (F)= 250 nm. A-C, imunoperoxidase, methyl Green. D-F, imunomarcação com ouro coloidal, citrato de chumbo e acetato de uranila.

## 5.5 Análise da expressão gênica por qRT-PCR

Os resultados da expressão dos genes *Col1α1*, *Alp*, *Igf-1*, *Ocn*, *Bsp*, *Opn*, *Rankl* e *Opg* podem ser observados nos gráficos das figuras 19 e 20. A análise dos níveis de mRNA no grupo Controle demonstrou que, de forma geral, ocorre um aumento da expressão dos genes estudados ao longo dos períodos de reparo do alvéolo. Este aumento foi significativo ( $p < 0.05$ ) nos períodos de 7 e 11 dias de reparo em relação aos períodos anteriores de 3 e 5 dias para os genes estudados, com exceção do gene *Bsp* (Fig. 19E), onde esta diferença foi encontrada mais cedo, a partir do período de 5 dias, e do gene *Opn* com níveis de expressão com uma tendência de aumento até os 7 dias e uma redução não significativa aos 11 dias de reparo (Fig. 19F,  $p > 0.05$ ).

A análise da expressão dos genes estudados no grupo PTH demonstrou que nos períodos iniciais de 3 e 5 dias de reparo, o tratamento causou uma regulação positiva nos níveis de mRNA dos genes *Alp*, *Col1α1*, *Igf-1* e *Ocn* (Fig. 19A a D). A expressão de *Alp* aumentou de forma significativa em relação ao grupo Controle ( $p < 0.05$ ) no período mais recente de reparo aos 3 dias (Fig. 19A), enquanto aos 5 dias houve aumento significativo ( $p < 0.05$ ) dos genes *Col1α1*, *Igf-1* e um pico de expressão de *Ocn* (Fig. 19D). Por outro lado, houve uma tendência de redução da expressão dos genes nos períodos posteriores de 7 e 11 dias no grupo tratado com PTH. Esta redução nos níveis de mRNA foi significativa para os genes *Col1α1* e *Igf-1* aos 7 dias (Fig. 19B e C), *Alp* e *Opn* aos 7 e 11 dias de reparo em relação ao grupo Controle ( $p < 0.05$ ) (Fig. 19A e F). A expressão do gene *Bsp* manteve o padrão de aumento nos períodos iniciais e redução dos níveis de mRNA nos períodos posteriores, mas sem alterações significativas ( $p > 0.05$ ) (Fig. 19E). Diferentemente, a expressão dos genes *Rankl* e *Opg* foi sempre menor em todos os períodos no grupo tratado com PTH que no grupo Controle, e esta redução de expressão foi significativa para o gene *Rankl* aos 7 e 11 dias e para *Opg* aos 11 dias ( $p < 0.05$ ) (Fig. 20 A e B). A razão *Rankl:Opg* (considerado um índice de osteoclastogênese) foi significativamente maior no grupo PTH aos 11 dias de reparo ( $p < 0.05$ ) (Fig. 20C).

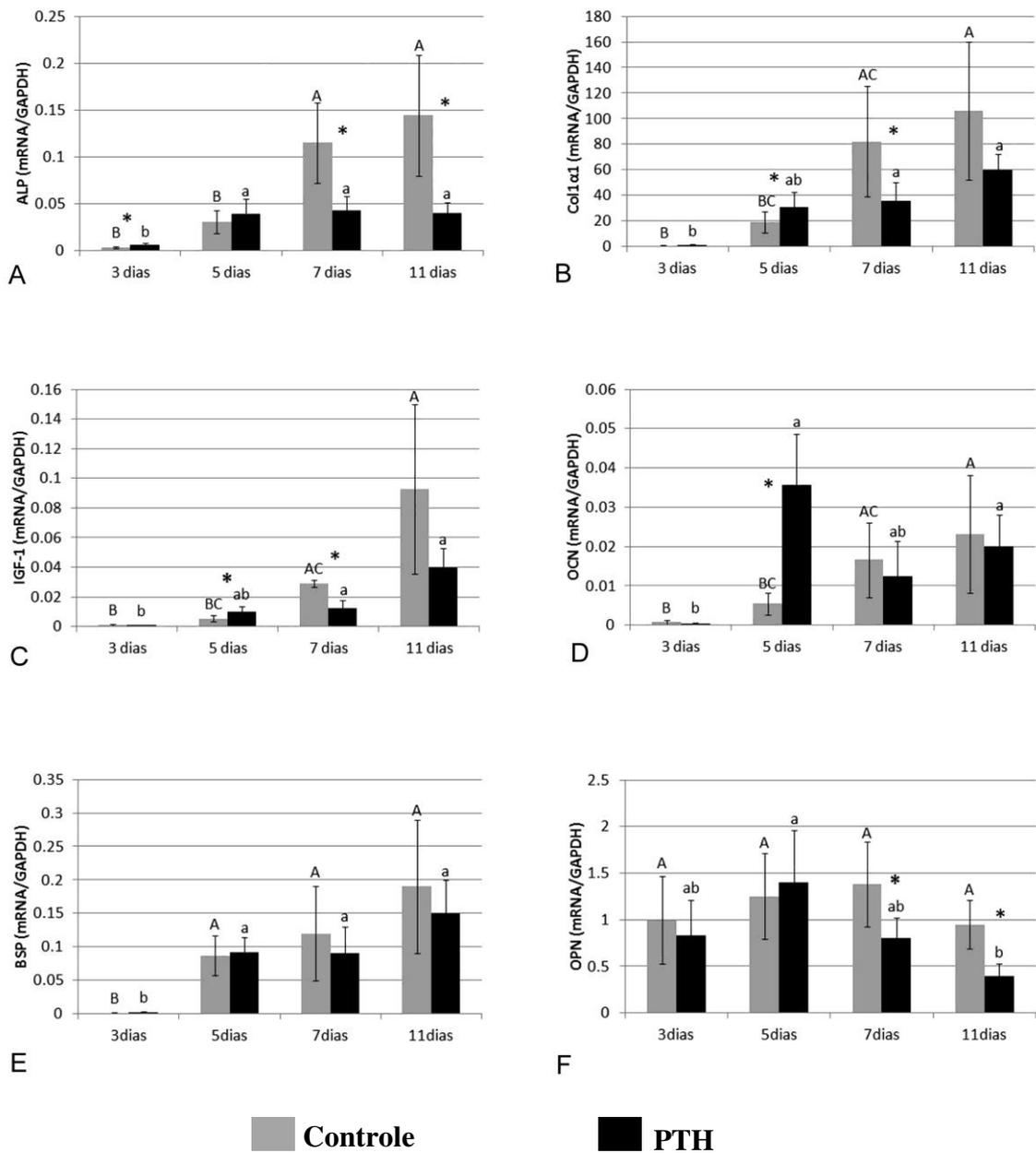


Figura 19 – Análise da expressão gênica por qRT-PCR. Os gráficos mostram a média e desvio padrão dos níveis de mRNA de *Alp* (A), *Col1a1* (B), *Igf-1* (C), *Ocn* (D), *Bsp* (E) e *Opn* (F). \* Diferença significativa entre os grupos. Letras diferentes representam diferenças intragrupo ( $p < 0.05$ ).

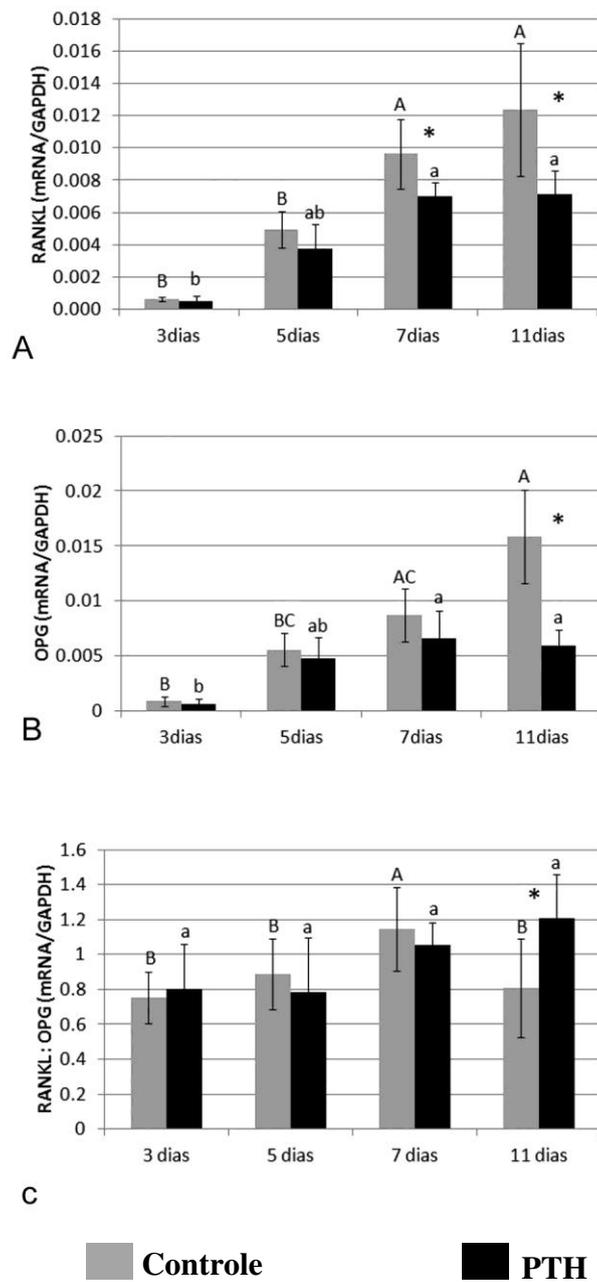


Figura 20 – Análise da expressão gênica por qRT-PCR. Os gráficos mostram média e desvio padrão dos níveis de mRNA de *Rankl* (A), *Opg* (B) e da razão *Rankl:Opg* (C). \* Diferença significativa entre grupos. Letras diferentes representam diferenças intragrupo ( $p < 0.05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, uma combinação de parâmetros morfológicos e moleculares foram utilizados para avaliar o efeito da administração intermitente de hPTH(1-34) nos estágios iniciais da cicatrização do alvéolo após exodontia de molares de ratos. Alguns trabalhos têm mostrado que o efeito anabólico do PTH parece ser dependente da dose administrada. Nakajima e colaboradores (2002) verificaram que a dose diária de 10µg/kg significativamente aumentou a resistência mecânica de calos de fratura em fêmures de ratos, enquanto a dose de 2µg/kg não teve efeito significativo. Outros estudos verificaram que 40µg/kg de PTH melhorou a cicatrização óssea em tíbias de ratos (Komrakova *et al.*, 2011) e preveniu a perda de osso alveolar em ratos com periodontite experimentalmente induzida (Barros *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2005). Com base nesses estudos e devido à falta de trabalhos mostrando o efeito do PTH no reparo alveolar na literatura, no presente estudo a dose de 40µg/kg injetada em dias alternados foi estipulada e esta dose mostrou-se eficaz em promover um aumento estatisticamente significativo na deposição de matriz óssea no início do reparo alveolar.

A presença de osso recém-formado foi primeiro observada aos 5 dias de reparo tanto em alvéolos do grupo controle quanto do grupo tratado com PTH, porém já neste período do reparo o grupo tratado com PTH apresentou um volume maior de osso. Associado a este resultado, a presença de osteoblastos no interior do alvéolo de ratos tratados com PTH foi significativamente maior neste período de 5 dias. Porém, aos 7 e 11 dias de reparo a quantidade de pontos contados sobre osteoblastos foi similar em ambos os grupos, enquanto o volume de osso recém-formado foi significativamente maior no grupo PTH. Estes resultados indicam que o PTH pode não estar causando alteração na quantidade de matriz óssea em todos os períodos, sugerindo que pode ter ocorrido um aumento real na quantidade de osteoblastos e no volume de osso apenas no período de 5 dias e que a diferença existente nos períodos de 7 e 11 dias seja um reflexo deste aumento de volume ósseo inicial, tornando todo o

processo de cicatrização mais adiantando em alvéolos de ratos tratados com PTH em relação ao controle.

O PTH tem ação direta em osteoblastos e seus precursores os quais contem receptores para este hormônio, estimulando proliferação, diferenciação e sobrevivência destas células (Dean *et al.*, 2005; Jilka, 2007; Aggarwal & Zavras, 2012). Nossos resultados indicam que os osteoblastos parecem ser o alvo inicial do PTH durante a cicatrização do alvéolo. Um estudo sobre a atividade proliferativa celular em alvéolos de molares de ratos mostrou que células em proliferação aumentam a partir de 12 horas após a extração do dente e tem o seu pico aos 5 dias, correlacionando com o início da formação óssea (Sato & Takeda, 2007). Ao avaliar o efeito do PTH no número de células PCNA-positivas (um marcador de proliferação celular) na cicatrização de fraturas de fêmures de ratos, Nakajima e colaboradores (2002) mostraram um número significativamente maior de células em proliferação no grupo tratado com PTH aos 2 dias de reparo, com nenhuma diferença significativa aos 4, 7 e 14 dias. Desta forma, um aumento no número de osteoblastos no interior do alvéolo, acompanhado de um aumento na deposição de matriz óssea aos 5 dias de reparo, pode refletir um efeito pontual deste hormônio no quinto dia, adiantando o processo de cicatrização que ocorreria naturalmente. O número de osteoblastos tende a diminuir à medida que o alvéolo é preenchido por tecido ósseo, pois muitos osteoblastos são aprisionados pela matriz óssea por eles produzida tornando-se osteócitos. Além disso, uma vez que estas células cessam a deposição de matriz elas podem se tornar células de revestimento ósseo ou morrerem por apoptose (Hadjidakis & Androulakis, 2006). Enquanto no grupo controle a quantidade de osteoblastos foi similar durante os períodos analisados, o número de osteoblastos no alvéolo de ratos tratados com PTH diminuiu significativamente com o tempo de reparo, correlacionando com um volume maior de osso no alvéolo destes ratos.

A expressão de alguns genes em amostras de tecido curetado dos alvéolos de ratos do grupo controle e tratado com PTH, foi verificada neste estudo utilizando-se qRT-PCR. Os genes analisados estão relacionados ao

tecido ósseo e são caracteristicamente expressos por osteoblastos (Kondo *et al.*, 1997; Sodek & McKee, 2000; Hadjidakis & Androulakis, 2006). A expressão dos genes *Col1 $\alpha$ 1* e *Alp*, marcam o início da diferenciação de osteoblastos, enquanto a expressão do gene *Ocn* está associada ao início de mineralização e é considerado um marcador de osteoblastos maduros (Kondo *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2004). Em nosso estudo estes genes foram positivamente regulados pelo PTH nos estágios mais iniciais do reparo alveolar (*Alp* – 3 dias, *Col1 $\alpha$ 1* e *Ocn* – 5 dias), correlacionando com uma quantidade maior de osteoblastos e volume de osso recém-formado nos alvéolos de ratos tratados com PTH. A ação do PTH em osteoblastos tem sido alvo de diversos estudos que mostram uma complexidade de vias de sinalização reguladas por este hormônio, culminando ou não em anabolismo ósseo (Swarthout *et al.*, 2002; Ferrandon *et al.*, 2009; Datta & Abou-Samra, 2009). O IGF-1 é um dos fatores que tem sido implicado como um possível mediador dos efeitos do PTH em osteoblastos (Canalis *et al.*, 1989; Bikle *et al.*, 2002; Watson *et al.*, 2003). No presente estudo, a expressão do gene *Igf-1* também se mostrou significativamente elevado aos 5 dias de reparo no grupo tratado com PTH, sugerindo um efeito do PTH na regulação deste gene durante o reparo alveolar. De um modo geral, aos 7 e 11 dias de reparo a expressão de *Col1 $\alpha$ 1*, *Alp*, *Ocn* e *Igf-1* foi menor em alvéolos de ratos tratados com PTH. A redução na expressão destes genes parece estar correlacionada com a diminuição significativa no número de osteoblastos observada no grupo PTH em função do maior volume de osso no alvéolo.

Sialoproteína óssea (BSP) e Osteopontina (OPN) são abundantes proteínas não-colagenosas da matriz óssea e, no que diz respeito à mineralização, tem sido mostrado que BSP parece ser um promotor e OPN um inibidor (Sodek & McKee, 2000; Robey, 2008). Os resultados deste trabalho mostraram que essas proteínas apresentam-se co-localizadas na matriz, mas apesar de apresentarem a mesma distribuição na matriz óssea, o perfil de expressão gênica destas proteínas durante o reparo alveolar diferiu. No grupo controle, *Bsp* teve sua expressão aumentada ao longo dos períodos estudados enquanto a expressão de *Opn* não mostrou alterações significantes. *Bsp* não

foi significativamente afetado pelo PTH em nosso estudo, enquanto *Opn* mostrou-se negativamente regulado pelo PTH aos 7 e 11 dias de reparo. A co-localização destas proteínas na matriz e o diferente padrão de expressão destas sugerem que estas moléculas exercem papéis diferentes e/ou complementares, e que *Opn* parece ser um dos alvos do PTH no osso alveolar. Um estudo mostrou que camundongos *knockout* para o gene da Osteopontina apresentaram maior formação de osso trabecular e cortical do que camundongos selvagens quando ambos foram tratados com injeções intermitentes de hPTH(1-34). Adicionalmente, análises *in vitro* verificaram que a deficiência de OPN elevou o efeito do PTH em aumentar a formação de nódulos mineralizados (Kitahara *et al.*, 2003). Apesar dos níveis inalterados de *Bsp* no presente estudo, a diminuição significativa da expressão de *Opn* pelo PTH pode ter favorecido ou mantido certo nível de mineralização nos períodos de 7 e 11 dias.

A formação do osso primário é acompanhada de remodelação até que este osso contenha morfologia e propriedades de um osso maduro (revisado em Nanci, 2008). Este estudo, assim como outros (Guglielmot e cabrini, 1985; Lin *et al.*, 1994), mostrou que a formação de trabéculas ósseas inicia-se a partir do ligamento periodontal remanescente. Acredita-se que remanescentes do ligamento periodontal servem como um suporte para a migração de células osteoprogenitoras durante a reparação do alvéolo (Devlin, 2000). Porém, neste estudo, aglomerados de células presentes no interior do alvéolo foram frequentemente observados aos 3 e 5 dias de reparo. Estas células poderiam representar um alvo do PTH neste estágio inicial do reparo ósseo alveolar, influenciando positivamente sua proliferação e diferenciação e resultando em maior deposição de matriz óssea. Assim como sugerido por trabalho prévio (Devlin, 2000), nosso estudo mostra que a formação óssea no reparo alveolar inicia-se sem prévia reabsorção óssea, um processo conhecido como formação óssea *de novo* (Quarles *et al.*, 1988). Aos 3 dias de reparo, osteoclastos TRAP-positivos foram observados na parede do alvéolo, principalmente próximos à crista alveolar e no fundo deste. Estes osteoclastos provavelmente já estavam presentes como parte do processo normal de remodelação do osso alveolar

junto ao ligamento periodontal (Gallina *et al.*, 2009; Lossdörf *et al.*, 2010). Outra evidência é o aumento de células apresentando marcação para RANKL, uma molécula essencial para a diferenciação de osteoclastos, enquanto o reparo do alvéolo prossegue, suportando assim a hipótese de que o estímulo para a osteoclastogênese no interior do alvéolo é tardio, provavelmente via sinalização dos osteoblastos.

O PTH pode aumentar tanto o número de osteoblastos quanto osteoclastos (Manolagas, 2000; Neer *et al.*, 2001). Neste estudo o aumento em osteoblastos foi inicial, demonstrando que estas células podem ser alvos diretos do PTH. Nos períodos estudados, segundo nossa contagem não houve diferença significativa no número de osteoclastos TRAP-positivos no alvéolo entre os grupos, e em ambos os grupos o período de 11 dias apresentou osteoclastos espalhados por todo o alvéolo, caracterizando o início de intensa remodelação óssea. RANKL foi imunolocalizada principalmente em osteoblastos, os quais estavam evidentes no interior do alvéolo aos 5 e 7 dias de reparo. Aos 11 dias, concomitante com o elevado número de osteoclastos TRAP-positivos no interior do alvéolo, RANKL foi evidentemente localizada em regiões de medula óssea que se formaram entre as trabéculas, osteoblastos e osteócitos jovens. Osteócitos são formados pelo aprisionamento de osteoblastos na matriz óssea e durante este processo apresentam características transitórias entre os dois estados da célula (Bonnucci & Nanci, 2001). Adicionalmente, estas células mantêm contato com as células da superfície óssea através dos seus processos celulares que se ramificam em canaliculos por todo o osso (Sodek & Mckee, 2000). Visualmente nenhuma diferença foi observada entre cortes de alvéolos do grupo Controle e PTH com relação à marcação para RANKL, correlacionando com um número similar de osteoclastos TRAP-positivos em ambos os grupos.

A ligação da molécula de OPG ao RANKL na membrana de osteoblastos e seus precursores previne sua interação com a RANK na membrana de precursores de osteoclastos inibindo a diferenciação destes em osteoclastos ativos (Boyce & Xing, 2008). Desta forma, a razão entre a expressão dos genes *Rankl* e *Opg* tem sido usada como um índice de tendência osteoclastogênica

(Huang *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2008; Giorgetti *et al.*, 2010; Rhee *et al.*, 2011). Aos 11 dias de reparo a razão *Rankl:Opg* mostrou-se significativamente maior no grupo PTH em relação ao grupo controle. O fato de a razão *Rankl:Opg* mostrar-se mais favorável a osteoclastogênese no grupo PTH corrobora com os resultados de alguns estudos onde o PTH aumentou o número de osteoclastos mesmo enquanto exercendo um efeito anabólico (Nakajima *et al.*, 2002; Vasconcelos, 2008). Apesar de o número de osteoclastos no alvéolo não ter sido diferente entre os grupos controle e PTH, a análise da relação *Rankl* e *Opg* mostrou que o PTH favoreceu o processo de osteoclastogênese aos 11 dias, sugerindo que uma taxa maior de remodelação pode ocorrer em períodos subsequentes. Este resultado também pode ser considerado um indício de que todo o processo de reparo do osso alveolar foi antecipado com o tratamento com PTH.

Muitas pesquisas se concentram em entender o mecanismo com que o PTH provoca anabolismo ósseo. Este hormônio parece ter um efeito amplo, alterando diretamente ou indiretamente a expressão de diversos genes e por diferentes vias, por este motivo o PTH tem sido o alvo de diversos estudos. Além do mais, existem muitas perspectivas com relação a este hormônio, pois tem sido mostrado que o PTH aumenta massa óssea sem causar severos efeitos colaterais (Neer *et al.*, 2001). Os resultados deste estudo mostraram um efeito favorável do PTH no reparo de alvéolos após a exodontia e assim como o uso do PTH para o tratamento da osteoporose já é uma realidade, acredita-se que o uso do PTH em outras áreas da saúde, incluindo a odontologia, será algo aplicável num futuro próximo. Portanto, investigações sobre o efeito e mecanismo de ação do PTH, em diversos modelos de estudo relacionados à clínica odontológica, em condições normais e patológicas, são importantes para o desenvolvimento de terapias adequadas para cada particularidade clínica que envolva tecidos mineralizados (osso, cimento e dentina), os quais têm sido mostrados responder ao PTH.

## **7. CONCLUSÃO**

O presente trabalho demonstrou que o tratamento intermitente com hPTH (1-34) teve um efeito anabólico sobre o processo de reparo do osso alveolar de forma pontual aos 5 dias, estimulando o aumento no número de osteoblastos e da expressão de genes relacionados a diferenciação e produção de matriz por estas células, causando conseqüentemente, um aumento no volume de tecido ósseo recém-formado no interior do alvéolo.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aggarwal P, Zavras A. Parathyroid hormone and its effects on dental tissues. *Oral Diseases*. 2012; 18: 48-54.

Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. *J Am Dent Assoc*. 1960; 61(7): 32-44.

Andersson N, Lindberg MK, Ohlsson C, Andersson K, Ryberg B. Repeated in vivo determinations of bone mineral density during parathyroid hormone treatment in ovariectomized mice. *J Endocrinol*. 2001; 170(3): 529-37.

Armento-Villareal R, Ziambaras K, Abbasi-Jarhomi SH, Dimarogonas A, Halstead L, Fausto A, *et al*. An intact N terminus is required for the anabolic action of parathyroid hormone on adult female rats. *J Bone Miner Res*. 1997; 12: 384–92.

Baht GS, Hunter GK, Goldberg HA. Bone sialoprotein-collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation. *Matrix Biol*. 2008; 27: 600-608.

Barros SP, Silva MAD, Somerman MJ, Nociti Jr FH. Parathyroid hormone protects against periodontitis-associated bone loss. *J Dent Res*. 2003; 82: 791-795.

Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, O'Brien CA *et al*. Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology*. 2005; 146(11): 4577–83.

Bendayan, M. Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Prog. Histochem. Cytochem*. 1995; 29: 1–159.

Bikle DD, Sakata T, Leary C, Elalieh H, Ginzinger D, Rosen CJ, Beamer W, Majumdar S, Halloran BP. Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone. *J Bone Miner Res.* 2002; 17(9): 1570-8.

Bodine PV, Seestaller-Wehr L, Kharode YP, Bex FJ, Komm BS. Bone anabolic effects of parathyroid hormone are blunted by deletion of the Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1. *J Cell Physiol.* 2007; 210(2): 352–7.

Bonucci E, Nanci A. Alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase in osteoblasts of normal and pathologic bone. *It J Anat Embryol.* 2001; 106 (Supplement 1): 129-133.

Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:139–46.

Bracco OL, Kayath MJ, Vieira JGH. Hormônio da paratireóide (1-34) no tratamento da osteoporose. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003; 47(3): 285-291.

Camarda AJ, Butler WT, Finkelman RD, Nanci A. Immunocytochemical localization of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid-containing proteins (osteocalcin) in rat bone and dentin. *Calcif Tissue Int.* 1987; 40:349-355.

Canalis E. Effect of hormones and growth factors on alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured rat calvariae. *Metabolism.* 1983; 32: 14-20.

Canalis E, Centrella M, Bach W, McCarthy TL. Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of PTH on bone cell cultures. *J Clin Invest.* 1989; 63: 60-65.

Civitelli R, Hruska KA, Shen V, Avioli LV. Cyclic AMP-dependent and calcium-dependent signals in parathyroid hormone function. *Exp Gerontol.* 1990; 25(3-4): 223-31.

Datta NS, Abou-Samra AB. PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell Signalling.* 2009; 21: 1245-1254.

Dean T, Khatri A, Potetinova Z, Willick G, Gardella TJ. Mechanism of interaction between the (17-31) binding domain of PTH and the PTH receptor. *In: Blondelle SE (ed.). Understanding biology using peptides.* San Diego, CA:American Peptide Society, 2005. p.344-346.

Devlin H, Garland H, Sloan P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996; 54: 1087-91.

Devlin H. Early bone healing events following rat molar tooth extraction. *Cells Tissues Organs.* 2000; 167: 33-7.

Ferrandon S, Feinstein TN, Castro M, Wang B, Bouley R, Potts JT, *et al.* Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol.* 2009; 5(10): 734-742.

Food and Drug Administration: FDA. Development of parathyroid hormone for the prevention and treatment of osteoporosis. May 2000; <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm071618.pdf>

Frolik CA, Black EC, Cain RL, Satterwhite JH, Brown-Augsburger PL, Sato M, *et al.* Anabolic and catabolic bone effects of human parathyroid hormone (1–34) are predicted by duration of hormone exposure. *Bone.* 2003; 33(3): 372–9.

Gallina S, Barranco-Piedra S, Torres-Lagares D, Baroukh B, Llorens A, Gutiérrez-Pérez JL, *et al.* Estrogen withdrawal transiently increased bone turnover without affecting the bone balance along the tooth socket in rats. *J Periodontol.* 2009; 80(12): 2035-2044.

Giorgetti APO, Neto JBC, Ruiz KGS, Casati MZ, Sallum EA, Nociti Jr. FH. Cigarette smoke inhalation modulates gene expression in sites of bone healing: a study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 110: 447-452.

Goldberg HA, Hunter GK. The inhibitory activity of osteopontin on hydroxyapatite formation *in vitro*. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 760: 305-308.

Grauschopf U, Lilie H, Honold K, Wozny M, Reusch D, *et al.* The N-terminal fragment of human parathyroid hormone receptor 1 constitutes a hormone-binding domain and reveals a distinct disulfide pattern. *Biochemistry.* 2000; 39: 8878-87.

Guglielmotti MB, Cabrini RL. Alveolar wound healing and ridge remodeling after tooth extraction in the rat: a histologic, radiographic, and histometric study. *J Oral Maxillofac Surg.* 1985; 43: 359-64.

Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone Remodeling. *Ann NY Acad Sci.* 2006; 1092: 385-396.

Hikita H, Miyazawa K, Tabuchi M, Kimura M, Goto S. Biphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. *J Bone Miner Metab.* 2009; 27(6): 663-72.

Hock JM, Fitzpatrick LA, Bilezikian JP. Actions of Parathyroid Hormone. *In:* Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. *Principles of Bone Biology.* 2ed. San Diego: Academic Press; 2002. v.1. p. 463-481.

Horwitz MJ, Tedesco MB, Gundberg C, Garcia-Ocana A, Stewart AF. Short-term, high-dose parathyroid hormone-related protein as a skeletal anabolic agent for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(2): 569-575.

Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Haloran BP, Bikle DD, Nissenson A. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res.* 2004; 19(2): 235-244.

Hunziker J, Wronski TJ, Miller SC. Mandibular bone formation rates in aged ovariectomized rats treated with anti-resorptive agents alone and in combination with intermittent parathyroid hormone. *J Dent Res.* 2000; 79: 1431–1438.

Iizuka T, Miller SC, Marks SC, Jr. Alveolar bone remodeling after tooth extraction in normal and osteopetrotic (ia) rats. *J Oral Pathol Med.* 1992; 21: 150-5.

Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest.* 1999; 104(4): 439-46.

Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone.* 2007; 40(6): 1434-1446.

Kitahara K, Ishijima M, Rittling SR, Tsuji K, Kurosawa H, Nifuji A, *et al.* Osteopontin deficiency induces parathyroid hormone enhancement of cortical bone formation. *Endocrinology* 2003; 144(5): 2132-2140.

Komrakova M, Stuermer EK, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, *et al.* Effect of human parathyroid hormone hPTH(1-34) applied at different regimes on fracture healing and muscle in ovariectomized and healthy rats. *Bone* 2010; 47:480-492.

Komrakova M, Krschek C, Wicke M, Sehmisch S, Tezval M, Rohrberg M, *et al.* Influence of intermittent administration of parathyroid hormone on muscle tissue and bone healing in orchietomized rats or controls. *J Endocrinol.* 2011; 209: 9-19.

Kondo H, Ohyama T, Ohya K, Kasugai S. Temporal changes of mRNA expression of matrix proteins and parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein (PTH/PTHrP) receptor in bone development. *J Bone Miner Res.* 1997; 12(12): 2089-97.

Kramer I, Keller H, Leupin O, Kneissel M. Does osteocytic SOST suppression mediate PTH bone anabolism? *Trends Endocrinol Metab.* 2010a; 21(4): 237-44.

Lima LL, Gonçalves PF, Sallum EA, Casati MZ, Nociti Jr. FH. Guided tissue regeneration may modulate gene expression in periodontal intrabony defects: a human study. *J Periodont Res.* 2008; 43: 459-464.

Lin WL, McCulloch CA, Cho MI. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. *Anat Rec.* 1994;240: 492-506.

Liu H, Guo J, Wang L, Chen N, Karaplis A, Goltzman D, Miao D. Distinctive anabolic roles of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and parathyroid hormone in teeth and mandible versus long bones. *J Endocrinol.* 2009; 203: 203-213.

Luck MD, Carter PH, Gardella TJ. The (1-14) fragment of parathyroid hormone (PTH) activates intact and amin-terminally truncated PTH-1 receptors. *Mol Endo.* 1999; 13:670-680.

Lossdörf S, Yildiz F, Götz W, Kheralla Y, Jäger A. Anabolic effect of intermittent PTH(1-34) on microenvironment during the late phase of periodontal repair in a rat model of tooth root resorption. *Clin Oral Invest.* 2010; 14: 89-98.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000; 21: 115-137.

Marques MR, Silva MAD, Manzi FR, Cesar-Neto JB, Nociti JrFH, Barros SP. Effect of intermittent PTH administration in the periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. *Arch Oral Biol.* 2005; 50: 421-429.

McKee MD, Farach-Carson MC, Butler WT, Hauschka PV, Nanci A. Ultrastructural immunolocalization of noncollagenous (osteopontin and osteocalcin) and plasma (albumin and  $\alpha_2$ HS- Glycoprotein) proteins in rat bone. *J Bone Miner Res.* 1993; 8(4): 485-496.

McKee MD, Nanci A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover and repair. *Microsc Res Tech.* 1996; 33: 141-164.

McMillan MD. Neutrophils in the molar tooth extraction wound in the rat: a transmission electron microscope (TEM) study. *J Oral Pathol Med.* 1999; 28: 97-302.

Millán JL. Alkaline phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal.* 2006; 2(2): 335-41.

Miller SC, Hunziker J, Mecham M, Wronski TJ. Intermittent parathyroid hormone administration stimulates bone formation in the mandibles of aged ovariectomized rats. *J Dent Res.* 1997; 76(8): 1471-1476.

Miyakoshi N, Kasukawa Y, Linkhart TA, Baylink DJ, Mohan S. Evidence that anabolic effects of PTH on bone require IGF-1 in growing mice. *Endocrinology.* 2001; 142(10): 349-56.

Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, Shimizu S, Moriya H, Einhorn TA, Yamazaki M. Mechanism for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34). *J Bone Miner Res.* 2002; 17(11): 2038-47.

Nanci A. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. *J Struct Biol.* 1999; 126: 256-269.

Nanci A, Wazen RM, Zalzal SF, Fortin M, Goldberg HA, Hunter GK, Ghitescu D. a tracer study with systemically and locally administered dinitrophenylated osteopontin. *J Histochem Cytochem.* 2004; 52(12): 1591-1600.

Nanci A. Osso. *In: Nanci A. (Ed.), Ten Cate Histologia Oral: Desenvolvimento, Estrutura e Função, 7ed.* 2008; Mosby Elsevier, Rio de Janeiro, RJ, pp. 141-190.

Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY *et al.* Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1434-1441.

Onyia JE, Bidwell J, Herring J, Hulman J, Hock JM. In vivo, human parathyroid hormone fragment (hPTH 1-34) transiently stimulates immediate early response gene expression, but not proliferation, in trabecular bone cells of young rats. *Bone.* 1995; 17(5): 479-84.

Quarles LD, Gitelman HJ, Drezner MK. Induction of de novo bone formation in the beagle. A novel effect of aluminum. *J Clin Invest.* 1988; 81: 1056-1066.

Quattrocchi E, Kourlas H. Teriparatide: a review. *Clin Ther.* 2004; 26:841–854

Rhee Y, Allen MR, Condon K, Lezcano V, Ronda AC, Galli C, *et al.* PTH receptor signaling in osteocytes governs periosteal bone formation and intracortical remodeling. *J Bone Miner Res.* 2011; 26(5): 1035-1046.

Robey PG. Noncollagenous bone matrix proteins. *In:* Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. *Principles of Bone Biology.* 3ed. San Diego: Academic Press; 2008. v.1. p. 335-349.

Pereira MC, Zecchin KG, Campagnoli EB, Jorge J. Ovariectomy delays alveolar wound healing after molar extractions in rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65: 2248-53.

Sato H, Takeda Y. Proliferative activity, apoptosis, and histogenesis in the early stages of rat tooth extraction wound healing. *Cells Tissues Organs.* 2007; 186: 104-111.

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

Smith N. A comparative histological and radiographic study of extraction socket healing in the rat. *Aust Dent J.* 1974; 19: 250-4.

Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology.* 2000; 24: 99-126.

Swarthout JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC. Parathyroid hormonedependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene*. 2002; 282: 1-17.

Tsutsui TW, Riminucci M, Holmbeck K, Bianco P, Robey PG. Development of craniofacial structures in transgenic mice with constitutively active PTH/PTHrP receptor. *Bone*. 2008; 42: 321-331. Tye CE, Hunter GK, Goldberg HA.

Identification of the type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction. *J Biol Chem*. 2005; 280: 13487–13492.

Vasconcelos DFP. Efeito da administração intermitente do fragmento 1-34 do hormônio paratireóideo em defeito fenestrado na mandíbula de ratos. Análise histomorfométrica. [Tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2008

Watson P, Lazowski D, Han V, Fraher L, Steer B, Hodsman A. Parathyroid hormone restores bone mass and enhances osteoblast insulin-like growth factor I gene expression in ovariectomized rats. *Bone* 2003; 16:357-365.

Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Ver Cytol*. 1969; 26: 235-302.

Zecchin KG, Pereira MC, Coletta RD, Graner E, Jorge J. Ovariectomy reduces the gelatinolytic activity and expression of matrix metalloproteinases and collagen in rat molar extraction wounds. *Calcif Tissue Int*. 2005; 76: 136-145

Zecchin KG, Jorge RS, Jorge J. A new method for extraction of mandibular first molars in rats. *Braz J Oral Sci*. 2007; 6(21): 1344-48.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Parecer do Comitê de Ética Animal



---

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp**

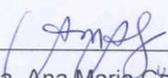
**CERTIFICADO**

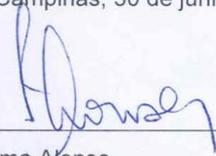
Certificamos que o Protocolo nº 1564-1, sobre "Efeito da administração intermitente de hPTH(1-34) no processo de reparo alveolar de molares de ratos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes / Juliana dos Santos Neves, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 30 de junho de 2008.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 1564-1, entitled "Effect of intermittent administration of hPTH(1034) on alveolar wound healing of rat molars", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on June 30, 2008.

Campinas, 30 de junho de 2008.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Maria Garaldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Afonso  
Secretária Executiva

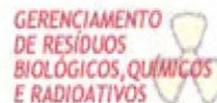
CEEA – Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

## 9.2 Parecer do Comitê de Ética Ambiental



Universidade Estadual de Campinas  
Coordenadoria Geral da Universidade  
**Comissão de Ética Ambiental**



Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 25 de junho de 2008.

### **Of. CGU/Resíduos/ Comissão de Ética Ambiental 122/2008**

Ao  
Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes  
Departamento de Morfologia  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP

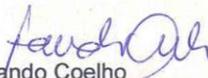
**Referência:** PARECER SOBRE RESÍDUO DE PROJETO FAPESP 2008: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTERMITENTE DE hPTH(1-34) NO PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR DE MOLARES DE RATOS.

Prezado Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes,

Segue, em anexo, o parecer sobre a destinação final dos resíduos a serem gerados no Projeto: "EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTERMITENTE DE hPTH(1-34) NO PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR DE MOLARES DE RATOS", conforme informações e resumo do projeto enviados à Comissão de Ética Ambiental da UNICAMP em 23/06/08.

Recomendamos a aprovação da destinação dada ao resíduo: incineração para o resíduo químico perigoso e tratamento em microondas, seguido de destinação final em aterro sanitário, para as cobaias (resíduo biológico infectante).

Atenciosamente,

  
Fernando Coelho  
Presidente da Comissão de Ética Ambiental  
Universidade Estadual de Campinas