

JULIANA DOS SANTOS NEVES

Cirurgiã-dentista

***IMUNOLOCALIZAÇÃO DE CSF-1, OPG E RANKL
NO PERIODONTO RELACIONADO AO ESMALTE
DE INCISIVOS DE RATOS EM ERUPÇÃO
NORMAL E CONTIDA.***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do Título de Mestre em
Biologia Buco-Dental, Área de Histologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes

PIRACICABA

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

N414i	Neves, Juliana dos Santos. Imunolocalização de CSF-1, OPG e RANKL no periodonto relacionado ao esmalte de incisivos de ratos em erupção normal e contida. / Juliana dos Santos Neves. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2008. Orientador: Pedro Duarte Novaes. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Imunohistoquímica. 2. Incisivos (Dentes). 3. Remodelação óssea. 4. Dentes - Erupção. I. Novaes, Pedro Duarte. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
-------	--

Título em Inglês: Immunolocalization of CSF-1, OPG and RANKL in the enamel-related periodontium of rat incisors in normal and immobilized eruption

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Immunohistochemistry. 2. Incisors (Tooth). 3. Bone remodeling. 4. Tooth eruption

Área de Concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Mestre em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Silvana Pasetto, Marcelo Rocha Marques, Pedro Duarte Novaes

Data da Defesa: 18-02-2008

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 18 de Fevereiro de 2008, considerou a candidata JULIANA DOS SANTOS NEVES aprovada.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Pedro Duarte Novaes".

PROF. DR. PEDRO DUARTE NOVAES

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Silvana Pasetto".

PROF.ª DR.ª SILVANA PASETTO

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marcelo Rocha Marques".

PROF. DR. MARCELO ROCHA MARQUES

*Dedico este trabalho à nossa equipe do laboratório de Microscopia Eletrônica e Imunomarcação, cujos integrantes **Cristiane Ribeiro Salmon, Eliene Ap. O. N. Romani, José Rosa Gomes, Nádia Fayez Omar e Prof. Pedro Duarte Novaes** foram de fundamental importância para a realização deste, não somente no quesito técnico/profissional mas também no desenvolvimento de importantes valores como amizade, confiança, solidariedade e trabalho em equipe.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Aos meus pais **Aldo e Janice** e à minha irmã **Janaina**, por este conceito sólido e vivo de família e de amor incondicional.*

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes**, pela consideração, transmissão de conhecimentos e principalmente pela oportunidade de crescer profissionalmente junto à histologia.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu Diretor **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**, por fornecer à sociedade um local de desenvolvimento científico e profissional.

À coordenação dos cursos de pós-graduação da FOP, na pessoa do **Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti** e ao coordenador do programa de pós-graduação em Biologia Buco-Dental, **Prof. Dr. Fausto Bérzin**.

À secretaria de pós-graduação, em nome de **Érica** e **Raquel**, pela competência e auxílio junto a toda parte burocrática durante o curso.

À secretaria do Departamento de Morfologia, em nome de **Suzete** e **Joelma**, pela atenção e ajuda.

Ao **CNPq**, pela bolsa de estudos a mim concedida, o que permitiu minha dedicação integral ao curso de mestrado.

Ao **Prof. Dr. José Merzel**, à **Profa. Dra. Darcy Tosello** e à **Dra. Maria Cristina Leme Godoy dos Santos** pela participação na banca de qualificação e pelas dicas e conselhos valiosos.

Aos professores **Dr. Sérgio Roberto Peres Line** e **Dra. Ana Paula de Souza Pardo**, por estarem sempre dispostos a auxiliar os alunos e pelo exemplo de dedicação ao trabalho.

À **Profa. Dra. Silvana Pasetto** por sua inestimável amizade, por aceitar fazer parte da banca examinadora de meu trabalho de mestrado e pela “herança” que nos foi deixada em relação à técnica de imunohistoquímica, possibilitando a realização de diversos trabalhos em nosso laboratório.

Ao **Dr. Marcelo Rocha Marques**, pela amizade, pela acolhida quando da minha chegada na FOP, pelos conselhos, pela companhia e por aceitar participar da banca examinadora de minha dissertação.

À amiga **Cristiane Ribeiro Salmon**, pela recepção, por me ajudar a fazer parte do laboratório de histologia, pelos primeiros ensinamentos junto ao laboratório e ao biotério e por me acompanhar e se preocupar comigo durante todo o trajeto do curso de mestrado. Muito Obrigada!

Aos amigos **Eliene Ap. O. N. Romani, José Rosa Gomes e Nádia Fayez Omar** por serem como se fossem minha família no ambiente de trabalho, obrigada por tudo!

Aos técnicos do laboratório de Histologia, **Gustavo, Cidinha e Ivani** pela ajuda durante a realização deste trabalho, pela amizade e pela companhia agradável na rotina do laboratório.

À doutoranda do curso de Radiologia Odontológica, **Adriana Dibo** por emprestar gentilmente o aparelho fotopolimerizador.

Aos amigos de pós-graduação: **Adriana Silva, Alexandre, Carol Almeida, Carol Guerra, Cris Borges, Daniel, Denise, Fábio Bianchi, Flávia, Gilcy, Glauce, Lisa, Marcos Frozoni, Marisi e Naila**, pelo apoio e agradável convivência no laboratório.

Às professoras **Zenaide, Daniela Janones e Paula Dechichi**, juntamente com os **funcionários e colegas do Laboratório de Histologia**, do **Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia** pelos primeiros ensinamentos em histologia e por me fazerem despertar para esta área.

Às minhas amigas da república **Camila, Carolina, Lorena, Mariana, Michele** e especialmente à **Renata, Simone** e **Vivian** por me acolherem e participarem do meu dia-a-dia em Piracicaba.

Ao **Henry** pelo zelo, carinho e companheirismo que fazem parte de minha vida desde que iniciei este trabalho e que se tornaram indispensáveis para mim.

Existe uma diferença entre o “desejar” e o “querer”, o desejo mede obstáculos enquanto a vontade vence-os.

(autor desconhecido)

RESUMO

Nos incisivos de ratos a face do alvéolo relacionada ao esmalte é continuamente reabsorvida do lado interno e neoformada no lado externo. Estudo realizado em nosso laboratório mostrou que em incisivos de ratos contidos por um período de 18 dias, há uma substituição de reabsorção óssea na face do alvéolo relacionada ao esmalte por neoformação óssea, onde osteoclastos foram substituídos por osteoblastos. CSF-1 e RANKL estimulam a proliferação e diferenciação de osteoclastos enquanto a OPG possui potente atividade inibitória da osteoclastogênese. O objetivo deste estudo foi analisar a distribuição e a intensidade do CSF-1, RANKL e OPG nos tecidos periodontais relacionados ao esmalte (PRE), de incisivos inferiores de ratos em erupção normal e após período de 18 dias de contenção, utilizando método imunohistoquímico e associando a análise quantitativa de osteoclastos. Quinze ratos Wistar machos tiveram seu incisivo inferior esquerdo imobilizado por meio de um fio de aço preso ao 1º molar inferior esquerdo por 18 dias. Quinze ratos com o incisivo esquerdo em erupção normal foram utilizados como controle. A taxa de erupção foi medida por meio de uma marca feita na face labial da coroa. No 18º dia de experimento os animais foram sacrificados e a região da crista alveolar do incisivo foi separada. Os incisivos de 12 ratos (6 controles e 6 contidos) foram fixadas e processadas para inclusão em Paraplast® e reação imunohistoquímica foi realizada utilizando anticorpos primários anti-CSF-1, OPG e RANKL. A intensidade de marcação do folículo dentário foi quantificada através de medida da densidade óptica, utilizando o “software” de análise de imagens Leica QWin (Leica imaging systems, Cambridge, UK) e ambos os grupos foram comparados pelo test t não-pareado. Para verificar a atividade osteoclástica, os incisivos de 18 ratos (9 controles e 9 contidos) foram fixadas e processadas para inclusão em Historesina® e foram realizadas a evidenciação da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e a contagem de osteoclastos TRAP positivos presentes em toda a extensão do osso alveolar que circunda o esmalte. A contenção com fio de aço mostrou-se eficiente

em imobilizar o incisivo. A diferença na quantidade de osteoclastos entre os grupos foi significativa ($p < 0.001$), sendo que no incisivo normofuncional a quantidade destes foi aproximadamente três vezes maior que no contido. Para o CSF-1 e OPG não houve, no folículo dentário, diferença estatisticamente significativa na intensidade de marcação entre os grupos ($p > 0.05$). Para RANKL o grupo contido apresentou-se com intensidade de marcação menor do que o normofuncional ($p < 0.01$). As moléculas estudadas estavam presentes no PRE, da região da crista de incisivos inferiores de ratos, em erupção normal e contida, sendo que na condição contida houve uma diminuição na intensidade de RANKL e da quantidade de osteoclastos. Diante desta observação, podemos concluir que alterações nos tecidos que compõem o PRE no incisivo contido, modificam o balanço na relação RANKL/OPG alterando o metabolismo das células que participam da remodelação óssea.

ABSTRACT

In the rat incisors the face of the socket related to the enamel is resorpted continually on the inner side and formed on the outer side. A study accomplished at our laboratory showed that in rat incisors immobilized by a period of 18 days, there is a replacement of bone resorption in the face of the socket related to the enamel by bone formation, where osteoclasts were substituted by osteoblasts. CSF-1 and RANKL stimulate the proliferation and osteoclast differentiation while OPG has a potent osteoclastogenesis inhibitory activity. The aim of this study was to analyze the distribution and intensity of CSF-1, RANKL and OPG in periodontal tissues related to the enamel (PRE) of rat lower incisors, in normal eruption and after the period of 18 days of containment, using immunohistochemical technique and associating the quantitative analysis of osteoclasts. Fifteen male Wistar rats had their left lower incisor immobilized by means of a steel wire attached to the first left lower molar for 18 days. Fifteen rats with the left lower incisor in normal eruption were used as control. The eruption rate was measured using landmarks in the labial face of the crown. The animals were killed on day 18th and the region of the alveolar crest of the incisor was split. The incisors of 12 rats (6 control and 6 immobilized) were fixed and processed for embedding in Paraplast and immunohistochemical assay was accomplished using primary antibodies anti-CSF-1, OPG and RANKL. The immunostaining of the dental follicle was quantified by measure of the optical density, using the image analysis software Leica QWin (Leica imaging systems, Cambridge, UK) and both groups were compared by test t. To verify osteoclast activity, the incisors of 18 rats (9 control and 9 immobilized) were fixed and processed for embedding in Historesin and to make the tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) evident. Osteoclasts TRAP positive in the whole length of the alveolar bone surrounding the enamel were counted. The incisor immobilization with steel wire was efficient. The difference in the number of osteoclasts between both rat groups was significant ($p < 0.001$). In the normal incisor, the number of osteoclasts was threefold greater than in the immobilized tooth. In the dental follicle, there wasn't significant

difference in the immunostaining intensity for CSF-1 and OPG between the groups ($p>0.05$). The immobilized incisor group showed immunostained intensity smaller than the normal incisor group ($p <0.01$). The studied molecules were present in PRE, in the region of the alveolar crest of rat lower incisor, in normal and immobilized eruption. There was a decrease in the intensity of RANKL immunostaining and in the number of osteoclasts in the immobilized condition. Hence, we concluded that changes in tissues of PRE, in the immobilized incisor, modify the RANKL/OPG ratio altering the metabolism of cells that participate in the bone remodeling.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA: Albumina de Soro Bovino.

CEEA – IB: Comitê de Ética em Experimentação Animal – Instituto de Biologia.

CEMIB: Centro Multidisciplinar de Investigação Científica.

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

DAB: Diaminobenzidina.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético.

FD: Folículo dentário.

FOP: Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

H₂O₂: Água oxigenada.

HCl: Ácido Clorídrico.

MgCl: Cloreto de magnésio.

mRNA: RNA mensageiro.

OA: Osso alveolar.

PBS: Fosfato Salino Tamponado.

PRE: Periodonto Relacionado ao Esmalte.

RT-PCR: Transcriptase Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase.

TDE: Taxa Diária de Erupção.

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Remodelação óssea e erupção dental em incisivos de ratos	3
2.2 Fator Estimulante de Colônias – CSF-1	5
2.3 Ligante do receptor ativador do fator kappa B – RANKL	6
2.4 Osteoprotegerina – OPG	7
3 PROPOSIÇÃO	10
4 MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Animais	11
4.2 Medida da taxa de erupção	12
4.3 Sacrifício e coleta do material	13
4.4 Reação imunohistoquímica	14
4.5 Reação histoquímica de TRAP	17
5 RESULTADOS	19
5.1 Taxa de erupção	19
5.2 Contagem de osteoclastos	20
5.3 Folículo dentário	21
5.4 Estruturas do osso alveolar	25
6 DISCUSSÃO	29
7 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37
ANEXO	42

1 INTRODUÇÃO

A maneira como o osso alveolar se remodela pode fornecer informações para um melhor entendimento da erupção de incisivos de crescimento e erupção contínuos.

O osso alveolar é continuamente remodelado por um processo que equilibra reabsorção óssea por osteoclastos seguida por deposição óssea por osteoblastos. Nos incisivos de ratos, a face do alvéolo relacionada ao esmalte (faces labial e parte da distal) é continuamente reabsorvida no lado interno e neoformada no lado externo (Gerlach *et al*, 2002).

Estudo realizado em nosso laboratório mostrou que em incisivos cujo crescimento e erupção em direção incisal foi interrompida por meio de contenção, houve inversão de reabsorção óssea na face labial interna do alvéolo por neoformação óssea (Salmon, 2004).

Muitas teorias tentam explicar o processo de erupção, a maior parte delas atribui aos tecidos adjacentes ao dente como mediadores deste processo (Marks & Schroeder, 1996), porém já foi demonstrado que o folículo dentário é o principal mediador (Cahill & Marks, 1980; Marks & Cahill, 1984).

A força eruptiva está relacionada à remodelação do osso alveolar. A necessidade de reabsorção do osso para erupção ocorrer foi inicialmente observada em roedores com osteopetrose, uma doença óssea congênita marcada por reduzida reabsorção óssea sem redução da formação, caracterizada pela falha na erupção dos dentes, mesmo quando eles estão totalmente formados (Marks, 1973). Uma vez que estes ratos foram tratados com injeções de fator estimulante de colônias (CSF-1) os dentes erupcionaram, mostrando que em ratos osteopetróticos a falha na erupção está diretamente relacionada à reduzida reabsorção óssea, característica da doença (Iizuka *et al*, 1992).

O folículo dentário é o principal local de concentração do CSF-1 (Wise *et al*, 1995), um fator de crescimento glicoproteico, que estimula especificamente a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células da linhagem mononuclear fagocítica (Das & Stanley, 1982).

O CSF-1 produzido pelo folículo dentário é quimiotático para monócitos e este quimioatrativo pode ser responsável pelo influxo de monócitos no folículo que se transformarão em osteoclastos e que por sua vez promoverão a reabsorção do osso alveolar, necessária para iniciar a erupção dental (Que & Wise, 1997).

A osteoprotegerina (OPG) é uma glicoproteína membro da superfamília do Fator de Necrose Tumoral receptor (TNFr). O modo pelo qual a OPG interage com as células alvo é se ligando ao seu receptor – OPGL, também conhecido como RANKL (receptor activator of nuclear factor – κ B ligand), uma citocina transmembrana expressa em osteoblastos que se liga à RANK, um receptor transmembrana presente em osteoclastos e seus precursores. A interação entre RANK e RANKL desencadeia uma série de mecanismos que resultam em diferenciação, maturação e ativação de osteoclastos. A OPG inibe a osteoclastogênese se ligando a RANKL e bloqueando sua interação com a RANK, portanto a OPG é um fator inibitório da osteoclastogênese (Simonet *et al*, 1997; Rosa-Ranal *et al*, 2001).

Neste estudo alguns fatores que influenciam o processo de erupção (CSF-1, OPG e RANKL) foram analisados associados à remodelação do osso alveolar de incisivos em diferentes condições de erupção. O incisivo foi o modelo escolhido, pois em dentes de crescimento contínuo a parte coronária do folículo é permanente, e outra vantagem destes dentes, é que a erupção pode ser experimentalmente alterada permitindo a observação da resposta dos tecidos envolvidos no movimento eruptivo. Sendo assim, a união de duas metodologias (contenção do incisivo e imunolocalização de proteínas) é algo mais no entendimento dos fatores ligados a reabsorção do osso alveolar, processo este indispensável para que ocorra a erupção do dente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Remodelação óssea e erupção dental em incisivos de ratos

Os incisivos de roedores crescem, mineralizam-se e erupcionam continuamente devido à presença de um epitélio odontogênico localizado na base do dente, juntamente com o tecido conjuntivo que originará a polpa, proliferando durante toda a vida do animal.

Estes dentes crescem tanto em comprimento, como em diâmetro durante a vida do animal (incisivos inferiores de ratos machos, entre 100 e 400g de peso corporal, aumentam em aproximadamente 90% seu comprimento e diâmetro. Em ratos a partir de 400g, o crescimento do dente praticamente cessa – Merzel 2007 informação pessoal), portanto, é como se a via eruptiva dos incisivos de ratos necessitasse de uma ampliação contínua.

Os tecidos periodontais dos incisivos de roedores são formados por um ligamento periodontal na superfície do dente onde a dentina é coberta por cimento (faces mesial, lingual e parte da distal), enquanto a face coberta por esmalte (labial e parte da distal) é coberta pelo órgão dental (também conhecido como órgão do esmalte) e por um tecido conjuntivo muito vascularizado. Este tecido periodontal relacionado ao esmalte (PRE) é similar ao tecido que envolve a coroa de molares de roedores quando esta é completamente formada e o movimento eruptivo intra-ósseo se inicia (Marks & Schroeder, 1996). Outra similiaridade entre os tecidos do PRE e aqueles relacionados à coroa de molares em desenvolvimento é que ambos parecem promover a reabsorção de seu osso alveolar relacionado (Gerlach *et al*, 2002). Em molares tal reabsorção começa após a coroa ser completada, já nos incisivos inferiores, a reabsorção da face labial do alvéolo começa provavelmente após a completa secreção do esmalte, o que acontece no nível do segundo molar, e aumenta em direção à crista alveolar (Cahill *et al*, 1988; Smith & Nanci, 1989 apud Gerlach *et al* 2002).

Trabalho realizado em incisivos de rato mostra que quando a raiz é ressecionada ou transecionada os dentes cessam sua erupção antes da

exfoliação. Nestes dentes parece que o ligamento periodontal permanece na região próxima a crista alveolar, enquanto o PRE é completamente perdido (Merzel *et al*, 2000a). Outro trabalho onde o PRE foi lesionado com instrumento endodôntico ocorreu um variável período de retardo da erupção e em alguns casos uma parada temporária do movimento eruptivo, enquanto lesões similares no ligamento periodontal tiveram nenhum efeito na erupção (Merzel *et al*, 2000b). Estes resultados mostram que o periodonto relacionado ao esmalte tem um papel essencial no processo eruptivo dos incisivos.

O processo de erupção é pensado ser multifuncional. Ele compreende o mecanismo responsável por gerar a força eruptiva, a tradução desta força em movimento, a resistência dos tecidos ao redor do dente e a remodelação de tais tecidos para manter a integridade do sistema. Qualquer mudança na erupção pode ser devido a uma mudança em um ou mais destes fatores (Moxham & Berkovitz, 1983).

Estudo realizado em incisivos de ratos utilizando marcadores fluorescentes mostrou que na face labial do osso alveolar, adjacente ao periodonto relacionado ao esmalte, ocorre reabsorção contínua com maior intensidade na região mais próxima à crista. Após período de contenção da erupção do incisivo, a alteração mais evidente na remodelação do alvéolo ocorreu nesta mesma região, onde houve conversão de reabsorção para formação óssea, na face labial do osso alveolar adjacente ao PRE, com formação de uma camada de osteoblastos sobre o osso, principalmente na metade mesial. Para explicar tais mudanças alguns fatores relacionados às forças compressivas exercidas pelo dente sobre o alvéolo foram considerados (Salmon, 2004).

Gerlach *et al* (2002) mostraram que a remodelação do osso alveolar em incisivos hipo e hiperfuncionais é similar, indicando que existem fatores comuns que causam este padrão de remodelação. Ao considerar os possíveis fatores, a taxa de erupção foi excluída uma vez que esta é duas vezes maior nos incisivos hipofuncionais do que nos normo e hiperfuncionais. O fator comum mais provável poderia ser a mudança na intensidade e/ou orientação das forças de mordida

dentro do ligamento periodontal, promovendo uma movimentação distal do incisivo.

Steigman *et al* (1989) examinaram os efeitos de forças oclusais funcionais, na morfologia do dente e tecidos periodontais, de incisivos de ratos em hipo e hiperfunção. Os resultados mostraram que a forma e o tamanho de dentes de crescimento contínuos são influenciados por forças oclusais funcionais, porém o osso alveolar propriamente dito parece não responder diretamente a função oclusal, mas se remodela de acordo com mudanças ocorrendo na morfologia do dente e de seu periodonto.

2.2 Fator Estimulante de Colônias – CSF-1

O fator estimulante de colônias tipo 1 – CSF-1 é um fator de crescimento glicoproteico, que estimula especificamente a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células da linhagem mononuclear fagocítica. Específicos receptores de superfície que mediam os efeitos biológicos do CSF-1 ocorrem exclusivamente em células mononucleares fagocíticas (Das & Stanley, 1982). O CSF-1 tem um efeito autócrino em sua própria expressão gênica, ficando assim seu receptor o responsável por inibir sua atividade (Wise, 1997).

O Folículo dentário é o principal local de concentração do CSF-1. Wise *et al* (1995), utilizando técnicas de hibridização *in situ* e RT-PCR, mostraram que o RNA mensageiro para o CSF-1 está presente *in vivo* no folículo dentário de molares inferiores de rato e imunomarcagem para o próprio CSF-1 revela que este RNA mensageiro é traduzido. Num período de 0 a 10 dias pós-natal, a expressão máxima de CSF-1 ocorreu no 3º dia, coincidindo com o fato de que neste mesmo dia há um influxo de monócitos no folículo dentário.

O CSF-1 faz parte de uma cascata de eventos moleculares que estão diretamente relacionados com a erupção dental, sendo responsável pelo recrutamento de monócitos, que se transformarão em osteoclastos e que por sua vez promoverão a reabsorção do osso alveolar, formando uma via eruptiva para que o dente alcance a cavidade bucal (Que & Wise, 1997).

Experimento em ratos osteopetróticos, em que há total ausência de dentes erupcionados, injeções de CSF-1 produziram um aumento no número de osteoclastos, bem como um aumento nos espaços medulares hematopoiéticos e os dentes erupcionaram, mostrando que em ratos osteopetróticos a falha na erupção está diretamente relacionada à reduzida reabsorção óssea, característica da doença (Iizuka, 1992).

Injeções de pamidronato, um bifosfonato que reduz a reabsorção óssea por osteoclastos, inibiram o tempo de erupção de molares e incisivos, no entanto, o pamidronato não inibiu a expressão gênica de CSF-1 e células precursoras mononucleares se fusionaram formando osteoclastos de tamanho maior, incluindo um número aumentado de núcleos, porém com atividade de reabsorção reduzida. Estes resultados mostram que a droga não age inibindo o sinal para a formação de osteoclastos e sim de maneira intrínseca nestas células diminuindo a habilidade destas em reabsorver osso. Assim, osteoclastos de tamanho maior se formam na tentativa de compensar sua baixa atividade (Grier & Wise, 1998).

2.3 Ligante do receptor ativador do fator kappa B – RANKL

Após as células mononucleares (precursoras de osteoclastos) terem sido recrutadas para o folículo dentário, deve haver um ambiente favorável na região do folículo dentário para promover a fusão destas células para formar osteoclastos. Assim, um outro fator conhecido com RANKL pode ser requerido para esta formação de osteoclastos (Wise *et al*, 2002).

O Ligante do receptor ativador do fator Kappa B (RANKL) foi identificado como uma proteína de membrana expressada em osteoblastos, células estromais (fibroblastos, pré-osteoblastos) e linfócitos T, essencial para a osteoclastogênese no micro-ambiente tecidual (Yasuda *et al*, 1998). Uma isoforma de RANKL sem qualquer domínio transmembrana, considerada ser uma forma solúvel, também foi relatada (Ikeda *et al*, 2001).

Camundongos *knockout* destituídos do gene para RANKL não possuem dentes erupcionados (Kong *et al*, 1999). Entretanto, estudos em que estes

camundongos nulos para RANKL foram resgatados com uma RANKL transgênica, tal como a expressada em linfócitos B e T, falhou em restaurar a erupção dental (Kim *et al*, 2000; Odgren *et al*, 2003). Nestes camundongos resgatados com a RANKL transgênica, osteoclastos e indícios de reabsorção óssea não foram vistos no osso alveolar ao redor do primeiro molar inferior, mas estavam presentes no endóstio de ossos longos (Odgren *et al*, 2003).

Para determinar se RANKL é expressa no folículo dentário de ratos *in vivo*, Yao *et al* (2004) isolaram por meio de microdissecção por captura a laser, a região do folículo dentário de primeiros molares inferiores a partir de cortes congelados, seguido por isolamento do RNA e RT-PCR. Os resultados mostraram que RANKL é expressa no folículo dentário nos dias 1 a 9 pós-natal. Dado este resultado, unido àqueles de Kim *et al* (2000) e Odgren *et al* (2003), os autores propuseram que o folículo dentário é a fonte de RANKL necessária para a osteoclastogênese requerida para a erupção dental.

O receptor para RANKL, chamado RANK, está presente na membrana de osteoclastos e seus precursores. RANKL ligada à membrana, expressada por osteoblastos/células do estroma e RANKL solúvel liberada no microambiente ósseo, interagem com RANK em precursores de osteoclastos resultando na diferenciação e ativação de osteoclastos maduros. Portanto, osteoblastos e células do estroma desempenham um papel essencial na osteoclastogênese. (Yasuda *et al*, 1998; Khosla, 2001).

2.4 Osteoprotegerina – OPG

A osteoprotegerina é uma glicoproteína membro da superfamília do Fator de Necrose Tumoral receptor (TNFr), porém não possui nenhum domínio transmembrana, sendo secretada como uma proteína solúvel. Transcritos de OPG foram detectados em vários tecidos de murinos, no entanto, sua expressão proeminente foi detectada em tecido cartilaginoso e ósseo (Simonet *et al*, 1997). A OPG inibe a osteoclastogênese através da ligação a RANKL expressada em

osteoblastos e prevenindo a sinalização célula/célula entre osteoblastos e células precursoras de osteoclastos (Yasuda *et al*, 1999).

OPG e RANKL potencialmente inibi e estimula, respectivamente, a diferenciação dos osteoclastos. Burgess *et al*. (1999) mostraram que estas moléculas também agem sobre osteoclastos maduros. RANKL age diretamente em osteoclastos maduros, completamente diferenciados, induzindo osteoclastos individuais a sofrerem uma rápida reorganização da actina de seus citoesqueletos em anéis de actina e executarem múltiplos ciclos de reabsorção óssea e a OPG bloqueia os efeitos da RANKL em ambas, formação dos anéis de actina e reabsorção óssea.

O gene para OPG é expresso no folículo dentário de primeiros molares inferiores de ratos e camundongos *in vivo*. Nestes dentes, expressão gênica de OPG no folículo dentário é reduzida no seu terceiro dia de vida em ratos e no quinto dia em camundongos. Isto correlaciona com os dias de influxo máximo de células mononucleares e osteoclastos no folículo dentário de ratos e de camundongos (Wise *et al*, 2000). Para determinar se as células do folículo dentário secretam a OPG, Wise *et al*. (2002a) realizaram um experimento *in vitro* onde fizeram cultura de células utilizando células do baço e adicionaram RANKL e CSF-1. A habilidade das células do baço cultivadas para formar osteoclastos era extremamente reduzida quando células do folículo dentário eram adicionadas. As células do folículo eram inseridas de maneira que não se encostavam nas células do baço, confirmando que é o produto secretado pelas células do folículo que inibe a osteoclastogênese. Adicionando anti-OPG a estas culturas, houve negação do efeito das células do folículo, demonstrando que OPG era a molécula inibitória secretada por estas células. As células do folículo também imunomarcaram, confirmando que elas sintetizam OPG.

Em primeiros molares inferiores de ratos, o CSF-1 e a proteína relacionada ao hormônio paratireóideo (PTHrP) regulam negativamente a expressão gênica da OPG no folículo dentário (Wise *et al*, 2003). A secreção de OPG pelas células do folículo dentário de molares de ratos é reduzida pelo CSF-1

ou pela PTHrP e é aumentada pela proteína morfogenética óssea 2 - BMP-2 (Wise *et al*, 2004).

Wise *et al.* (2005) compararam a expressão de OPG em ratos osteopetróticos, deficientes em CSF-1, com a expressão em seus semelhantes normais em várias idades. A expressão gênica de OPG encontrou-se maior no folículo dentário dos ratos mutantes do que em ratos normais. Transferindo um específico mRNA de CSF-1 para as células do folículo dentário de ratos mutantes, resultou em uma diminuição da expressão de OPG, sustentando a hipótese de que a diminuição na expressão de OPG, necessária para a erupção dental, é mediada pelo CSF-1.

A maioria dos relatos sobre a osteoclastogênese mediada por CSF-1, RANKL e OPG para a remodelação do osso alveolar durante a erupção dental empregam dentes molares como modelo de estudo. Pouco foi investigado sobre este assunto em incisivos de crescimento e erupção contínuos, surgindo inclusive o questionamento de que se a ativação e/ou inibição de osteoclastos em incisivos se dá ou não a partir das mesmas moléculas que atuam no periodonto de molares, assim como possíveis coincidências e diferenças no padrão espacial e temporal de expressão destas moléculas.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi analisar a distribuição e a intensidade do CSF-1, RANKL e OPG nos tecidos periodontais relacionados ao esmalte (PRE), de incisivos inferiores de ratos em erupção normal e após período de 18 dias de contenção, utilizando método imunohistoquímico e associando a análise quantitativa de osteoclastos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Para este estudo foram utilizados trinta ratos Wistar machos com peso médio de 300 gramas. Os ratos foram adquiridos do CEMIB-UNICAMP, mantidos 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), tratados com ração balanceada padrão sólida (Labina, Cargill, Brasil) e água *ad libitum*, de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, segundo o CEEA-IB-UNICAMP (em Anexo).

No primeiro dia do experimento quinze animais foram anestesiados com Ketamina (Dopalen, Vetbrands, Brasil) 80mg/Kg de peso do animal, associado ao relaxante muscular Cloridrato de Xylazina (Rompun, Bayer, Brasil) 8mg/Kg e receberam uma contenção com fio de aço número 0,45 para impedir a erupção do incisivo inferior esquerdo. Uma das extremidades do fio foi presa a um orifício na face labial do dente perfurado com uma broca Carbide 1/4 (Sorensen, KG, Brasil) preenchido com resina fotopolimerizável (Filtek™ Supreme, 3M ESPE, USA), enquanto a outra extremidade envolvia o primeiro molar inferior esquerdo (Fig.1). A contenção foi mantida durante 18 dias. O grupo controle era constituído pelo incisivo inferior esquerdo de quinze ratos com erupção normal.



Fig.1: Contenção do incisivo esquerdo com fio de aço. O incisivo está preso ao primeiro molar inferior esquerdo. Nesta figura, a resina que preenche o orifício onde o fio se insere ainda não foi colocada.

4.2 Medida da taxa de erupção

Em todos os animais foi feita com a broca uma marca de referência na face labial do incisivo esquerdo, no limite da papila interdentária. Durante o período de experimento a erupção foi medida da margem gengival do incisivo direito até a marca feita no incisivo esquerdo, com o auxílio de uma lupa acoplada com uma régua milimetrada, estando os animais sob rápida anestesia com Halotano (Cristália, Brasil) (Fig.2). Os incisivos do grupo contido tiveram o valor obtido dividido por 18 para obter a taxa diária média de erupção (TDE), já o grupo controle a erupção foi medida semanalmente e o valor dividido por 7 para obtenção da TDE, uma vez que a marca poderia desaparecer já que o dente não estava preso.

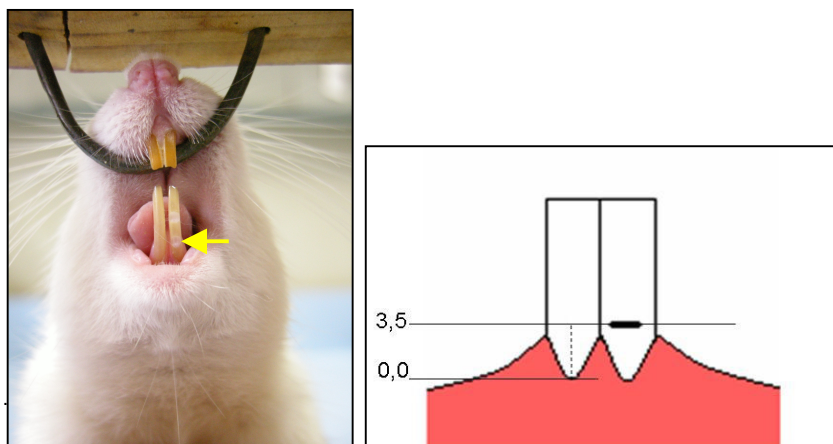


Fig.2: Medida da taxa de erupção. Os números no esquema são meramente ilustrativos.

4.3 Sacrifício e Coleta do Material

No décimo oitavo dia de experimento os ratos foram anestesiados e sacrificados. Dos quinze ratos de cada grupo seis foram utilizados para imunohistoquímica e nove para a reação de TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato). Após descalcificação, utilizando uma lâmina de aço foi separada a **região de diastema** do incisivo, que vai da crista alveolar até a face mesial do primeiro molar. Durante a inclusão propriamente dita as peças foram orientadas de modo que fossem obtidos cortes transversais no sentido ápico-incisal do incisivo (Fig.3).

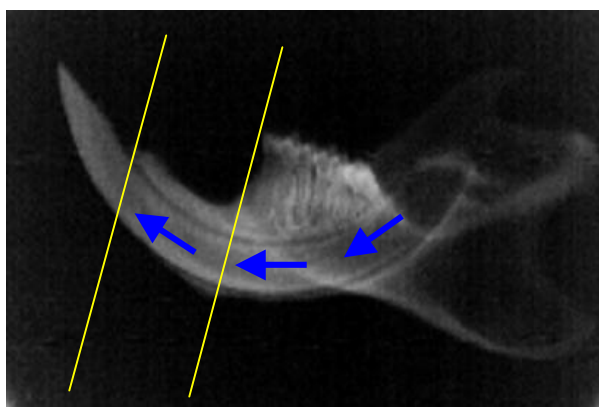


Figura 3: As linhas em amarelo delimitam a região de diastema do incisivo. As setas em azul apontam o sentido ápico-incisal do dente.

- **Coleta do material para imunohistoquímica:**

Para a retirada das mandíbulas, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular contendo Ketamina (Dopalen, Vetbrands) 80mg/Kg de peso do animal, associado ao relaxante muscular Cloridrato de Xylazina (Rompun, Bayer, Brasil) 8mg/Kg e sacrificados por perfusão intracardíaca com uma solução fixadora contendo 2% paraformaldeído, 0,25% glutaraldeído e 0,1% ácido pícrico à 37°C. O tempo de perfusão para cada animal foi de 10 minutos. As mandíbulas foram dissecadas, separadas em hemimandíbulas e imersas na mesma solução fixadora, porém, com o dobro da concentração da solução de perfusão, overnight à 4°C. Após a fixação, as peças foram lavadas em tampão PBS, descalcificadas em EDTA 4,13% à temperatura ambiente e incluídas em Paraplast (McCormick™, USA). Cortes com 4µm de espessura foram feitos em micrótomo automático (RM 2155, Leica Microsystems, Alemanha) e coletados em lâminas silanizadas (3-aminopropyltriethoxy-silane, Sigma Aldrich, USA), dois cortes por lâmina.

- **Coleta do material para o método histoquímico de TRAP:**

Para retirada das mandíbulas, os animais foram sacrificados por excesso de anestesia em Halotano (Cristália, Brasil). As mandíbulas foram dissecadas, separadas em hemimandíbulas e fixadas por imersão em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato, com 7% de sacarose (pH 7.4) à 4°C por 4 horas. Após fixação, as peças foram lavadas em tampão Tris overnight, descalcificadas em EDTA 10% em tampão Tris (pH 7.4) à 4°C e incluídas em resina histológica (Historesin, Leica Microsystems, Alemanha). Cortes semi-seriados de 3µm foram coletados em lâminas gelatinadas.

4.4 Reação Imunohistoquímica

Para a imunohistoquímica foi utilizado o método indireto com sistema de amplificação (biotina - streptavidina - peroxidase). Em uma cubeta de vidro, os

cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em uma série decrescente de álcool (absoluto, 80% e 50%) e água. Em seguida foram imersos em H₂O₂ 20V (Dinâmica, Brasil) - 2x por 6 min. para inativar a atividade da peroxidase endógena existente no tecido e lavados em água destilada e tampão PBS. Para o bloqueio de outras proteínas presentes no tecido, os cortes foram incubados em câmara úmida com uma solução de BSA 3% (Pentex, USA) em tampão PBS por 30 min. à temperatura ambiente, para diminuir a reação de fundo (marcação inespecífica).

Após breve lavagem em tampão PBS, os cortes foram incubados nos seguintes anticorpos policlonais produzidos em cabra, anti-M-CSF humano (cód. M-6171, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), anti-OPG humano e anti-RANKL camundongo (cód. SC-8468 e SC-7628, respectivamente, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) diluídos em solução de BSA 1% em PBS. As diluições e o tempo de incubação foram 1:80 (12,5µg/ml) por 3 horas à temperatura ambiente para M-CSF, 1:100 (2µg/ml) e 1:150 (1,3µg/ml) overnight (~15h) à 4°C para OPG e RANKL, respectivamente. Passado o tempo de incubação no anticorpo primário, os cortes foram lavados em PBS e submetidos ao “Kit” LSAB – HRP (DAKO Cytomation, Dinamarca) de amplificação, composto pelo anticorpo secundário biotinilado (reagente amarelo) por 30 minutos à 37°C e streptavidina conjugada à peroxidase (reagente vermelho) também por 30 minutos à 37°C. Após cada reagente os cortes foram lavados em PBS. As reações foram reveladas por 3 minutos à 37°C em uma solução contendo 50 mg de DAB (3,3 diaminobenzina, Sigma Aldrich, USA) em 80ml de PBS, adicionado de 1ml de H₂O₂ 20V (Dinâmica, Brasil) e 1ml de DMSO (dimetilsulfóxido P.A., ECIBRA®, Brasil) – a revelação se dá pela reação química entre o DAB, a peroxidase do anticorpo secundário e o peróxido de hidrogênio adicionado na solução de revelação, formando um precipitado marrom, insolúvel e permanente. Ao final da revelação os cortes foram lavados em água destilada, desidratados e as lâminas montadas com Permount® (Fisher Chemicals, USA). Duas lâminas de cada animal passaram por contra-coloração com hematoxilina de Harris (Dinâmica, Brasil) por 30 segundos.

Como controle negativo, em todas as reações realizadas, dois cortes foram submetidos ao mesmo tratamento omitindo-se somente os anticorpos primários, utilizando no lugar destes a solução de diluição (BSA 1% em PBS).

Análise da reação:

Os cortes contra-corados com hematoxilina foram analisados em microscópio de luz (Leica DMLP, Leica Microsystems, Alemanha) acoplado a uma câmera de vídeo (DFC 280, Leica Microsystems, Alemanha). As imagens transferidas para o computador foram capturadas através do “software” Image Manager (IM50, Leica Microsystems, Alemanha). Uma análise qualitativa foi feita com relação à marcação imunohistoquímica nos tecidos que envolvem o dente (folículo, células, osso alveolar).

Uma análise quantitativa foi realizada para estabelecer se houve diferença na intensidade de marcação do *folículo dentário*, entre os grupos normofuncional e contido. Três lâminas (6 cortes) de cada animal que não foram contra-coradas, ou seja, apenas reveladas com DAB, foram quantificadas utilizando o *software* de análise de imagens Leica QWin (Leica imaging systems, Cambridge, UK) (Fig 4). As imagens foram capturadas utilizando-se sempre a lente objetiva de 10x e somente a região do folículo dentário foi selecionada. O programa transforma a cor emitida pelo DAB para uma escala da cor cinza que vai de 0 (preto) até 255 (próximo de branco). Desta forma, somente as estruturas evidenciadas pelo DAB aparecerão em cinza na tela do computador e o *software* mede a densidade óptica dentro da escala de cinza, onde quanto maior a medida da densidade óptica menor é a intensidade de marcação.

O uso de programas de análise de imagens para quantificação de imunohistoquímica já foram descritos (Walker, 2006), porém, não somente neste caso, mas para qualquer tipo de quantificação o material a ser analisado dever passar por uma padronização que inclui espessura do corte, tempo de revelação, área a ser medida e intensidade de luz do microscópio.

Os dados foram analisados utilizando o pacote estatístico do programa GraphPad Prism 4 (MackievTM, USA). As medidas das densidades ópticas dos folículos de cada grupo foram comparadas pelo test t não-pareado. Foi feita uma comparação entre os grupos normofuncional e contido para cada anticorpo.

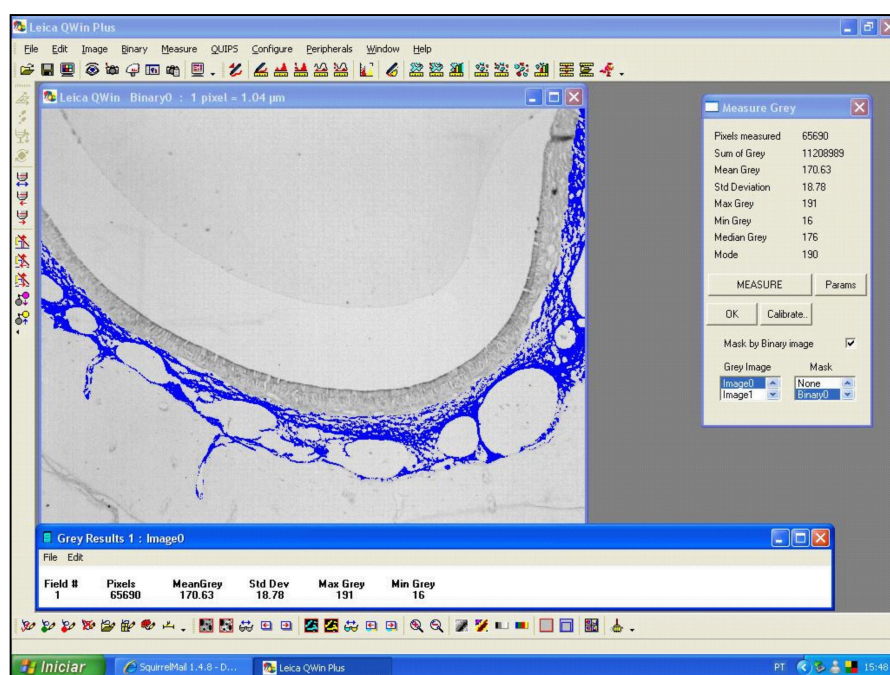


Fig. 4 – Medida da densidade óptica em escala de cinza feita pelo “software” Leica QWin. Toda a área que não pertencia ao folículo foi excluída, inclusive ameloblastos, camada papilar e luz de grandes vasos sangüíneos. A medida foi feita somente no tecido marcado em azul, sempre no aumento de 100x.

4.5 Reação histoquímica de TRAP (Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato)

Inicialmente foi preparada uma solução de 4mg de naphtol AS-BI phosphate substrate (Sigma Aldrich, USA) em 0,25 ml de N,N dimetil formamida (Sigma Aldrich, USA), seguido da adição de 25ml de tampão acetato 0,2M (pH 5,0), 35 mg de Fast Red Violet LB (Sigma Aldrich, USA), e 60µl de MgCl a 10%. Em seguida a solução foi filtrada, aquecida a 37°C e acrescida de L(+) ácido tartárico (Sigma Aldrich, USA), na concentração de 50mM. As lâminas contendo cortes do material foram incubadas por 1h30min. (Cole & Walters, 1987). Após a

incubação, as lâminas foram lavadas por 30 min. em água corrente, secas à temperatura ambiente, contra-coradas com hematoxilina de Harris (Dinâmica, Brasil) por 7min. e montadas com lamínulas utilizando Entellan® (Merck, Alemanha).

Contagem dos osteoclastos:

Nas lâminas coradas pelo método histoquímico de TRAP foi feita a contagem de osteoclastos TRAP-positivos, com 2 ou mais núcleos, em toda a extensão do osso alveolar que circunda o esmalte (Fig.5), utilizando a lente objetiva de 100x do microscópio. Para cada corte contado, a extensão do osso alveolar que envolve o esmalte, foi medida em milímetros por meio do software de análise de imagens Image tool 3 (University of Texas, USA). Para cada animal foram coletados cinco cortes semi-seriados com intervalos de 45µm entre um corte e outro, totalizando um total de 45 cortes em cada grupo. Os valores obtidos foram comparados estatisticamente pelo test t não-pareado.



Fig. 5: Corte transversal de região de diastema. A linha verde delimita o osso alveolar que circunda o esmalte dental, onde foi feita a contagem de osteoclastos. Barra: 200µm.

5. RESULTADOS

5.1 Taxa de Erupção

No grupo normofuncional a taxa diária média de erupção do incisivo esquerdo foi de 0,5mm ($\pm 0,1$ mm), que é considerada normal (Michaeli, 1986). No grupo com erupção contida, a contenção com fio de aço manteve a taxa de erupção diária próxima à zero (0,05mm, $\pm 0,03$) (Fig.6).

As modificações ocorridas na morfologia do dente contido foram semelhantes às previamente descritas por Salmon, 2004. Em resumo, aumento na espessura de dentina com conseqüente redução no diâmetro da câmara pulpar, aumento da aposição óssea nas faces mesial, lingual e distal do osso alveolar relacionado ao ligamento periodontal; inversão de reabsorção para aposição óssea na face labial do osso alveolar adjacente ao PRE; e mudança na morfologia dos ameloblastos, que se tornaram achatados ou cubóide.

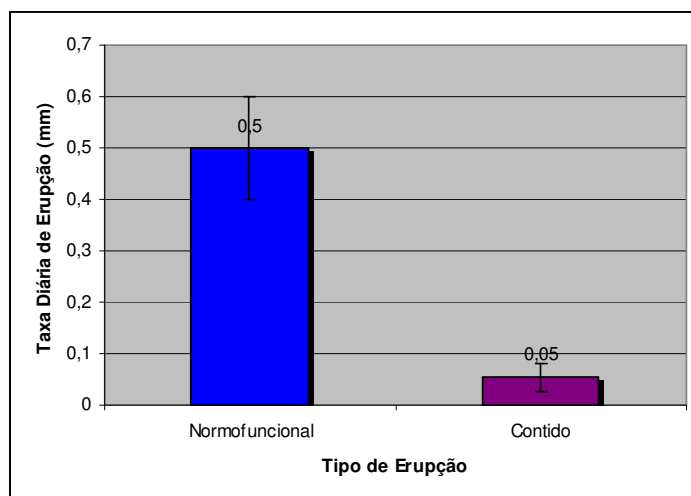


Fig. 6 – Medida da taxa diária de erupção em milímetros (média $\pm$ desvio padrão) do incisivo esquerdo nos grupos normofuncional e contido.

5.2 Contagem de Osteoclastos

Osteoclastos TRAP positivos, que margeavam o osso alveolar que envolve o esmalte dental, foram contados. Para o grupo normofuncional o valor médio foi de 3,67 ($\pm 0,7$) osteoclastos por milímetro, enquanto para o grupo contido a média foi de 1,24 ($\pm 0,66$) osteoclastos por milímetro. Houve uma diferença significativa no número de osteoclastos entre os grupos ($p < 0.0001$), sendo que no incisivo normofuncional a quantidade destes foi aproximadamente três vezes maior que no contido (Fig. 7). Pôde-se observar que a maioria dos osteoclastos estava na metade distal da face labial, tanto no grupo controle quanto no contido. Também foi observado que no grupo contido a marcação para TRAP nos osteoclastos estava mais fraca (Fig.9).

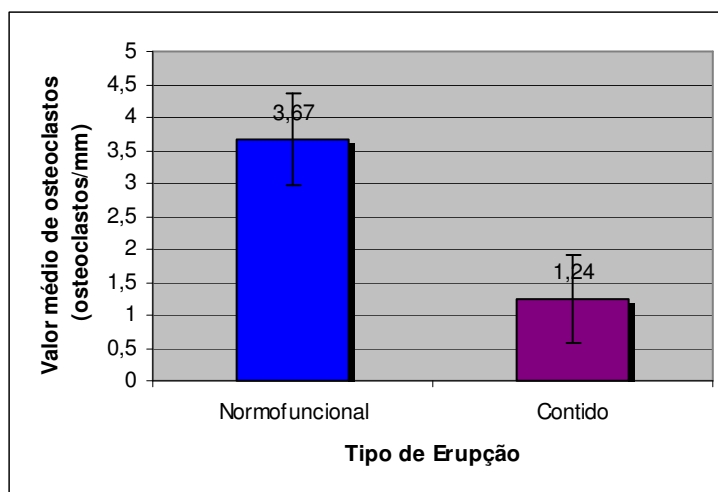


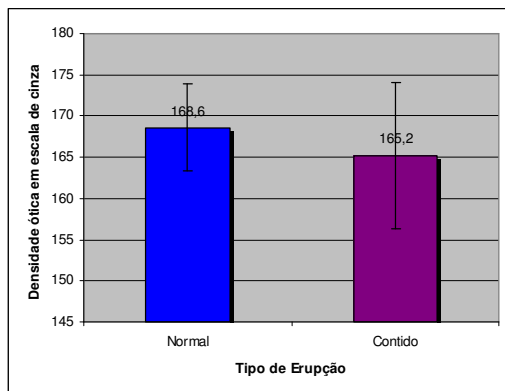
Fig. 7 – Contagem de osteoclastos TRAP positivo margeando o osso alveolar relacionado ao esmalte. No incisivos normais a média foi de 3,67 osteoclastos/mm (DI $\pm 0,7$) contra apenas 1,24 osteoclastos/mm (DP $\pm 0,66$) no incisivos contidos.

5.3 Folículo Dentário

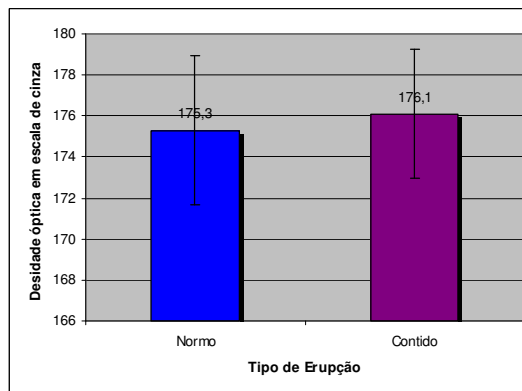
Para o CSF-1 e OPG não houve diferença estatisticamente significativa na intensidade de marcação entre os grupos ($p>0.05$, fig.8 A e B). Para RANKL o grupo contido apresentou-se com intensidade de marcação menor do que o normofuncional ($p<0.05$, fig.8C). Nesta avaliação, quanto maior a medida da densidade óptica significa que mais fraca é a intensidade de marcação, uma vez que a quantidade de luz que atravessa o corte é maior. A marcação imunohistoquímica no folículo para os três fatores (CSF-1, OPG e RANKL), em ambos os grupos, está ilustrada na fig.10.

Em análise do folículo dentário em maior aumento (500x ou 1000x) observou-se a presença de células mononucleares, tanto nos incisivos contidos quanto nos normofuncionais (Fig.11). Essas células foram identificadas pela morfologia de seu núcleo e pelo tamanho em relação a outras células também presentes no local, como linfócitos e neutrófilos, estando presentes também dentro de vasos sangüíneos onde são facilmente reconhecidas como monócitos.

A. CSF-



B. OPG



C. RANKL

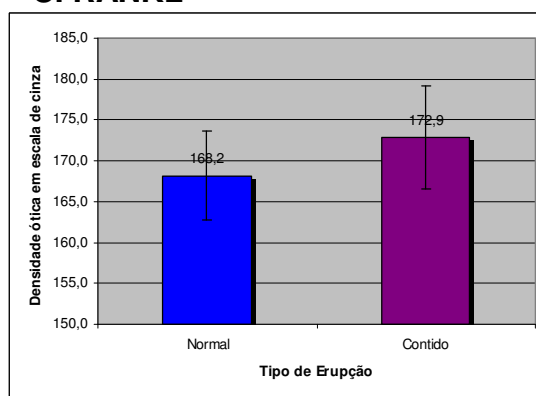


Fig. 8 – Intensidade de marcação para Fator Estimulante de Colônias (CSF-1), Osteoprotegerina (OPG) e Ligante do receptor ativador do fator kappa B (RANKL) no folículo dental (FD) através da medida da densidade ótica em escala de cinza (média $\pm$ DP). Para CSF-1 e OPG (gráficos A e B, respectivamente) não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0.05$) entre os grupos normal e contido. Para RANKL (gráfico C), o grupo contido apresentou intensidade de marcação no FD menor do que o normofuncional ($p = 0.0049$ sendo $p < 0.05$). A análise estatística foi feita utilizando teste t não-pareado. O maior valor de densidade ótica corresponde a uma menor intensidade de marcação.

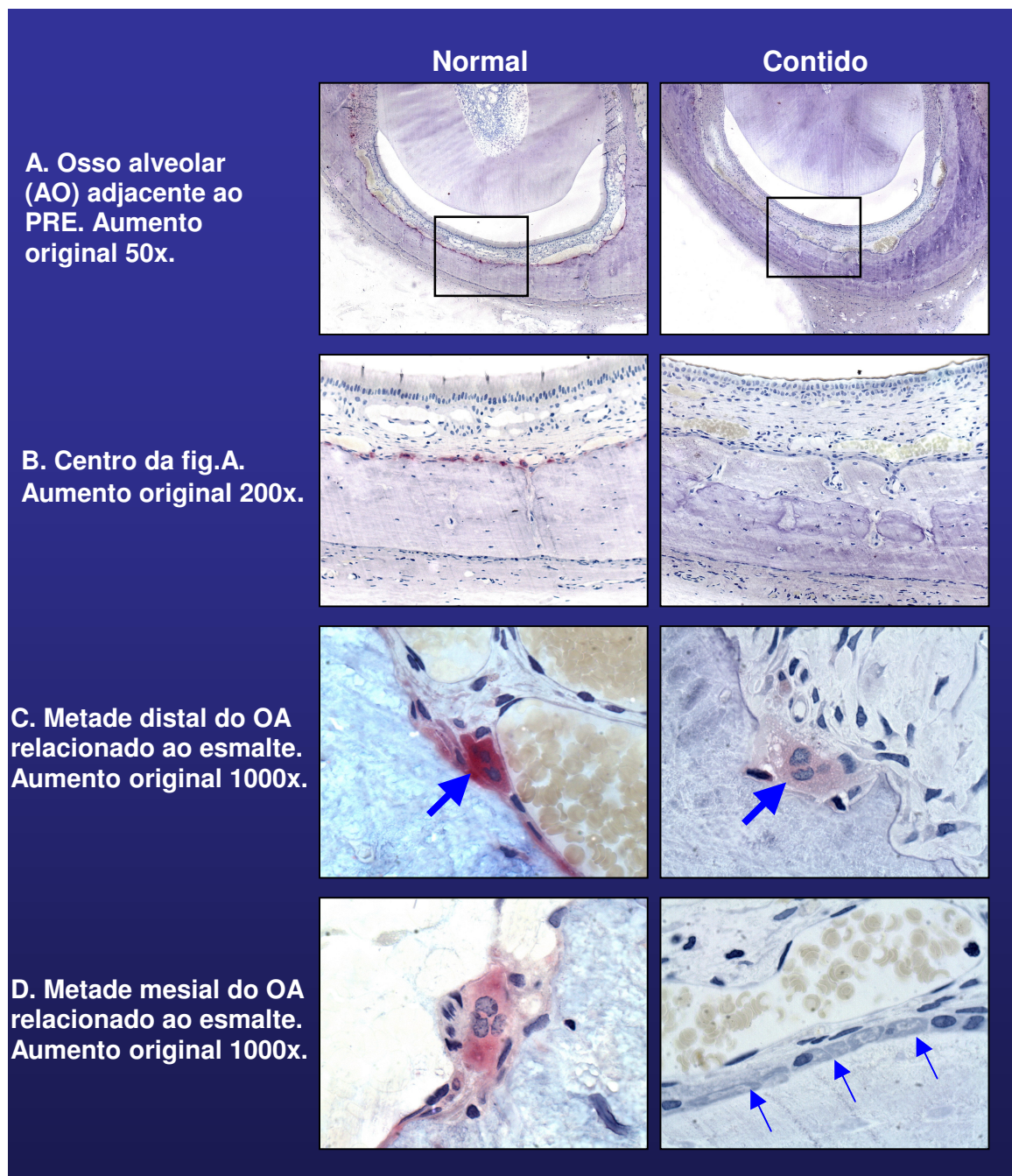
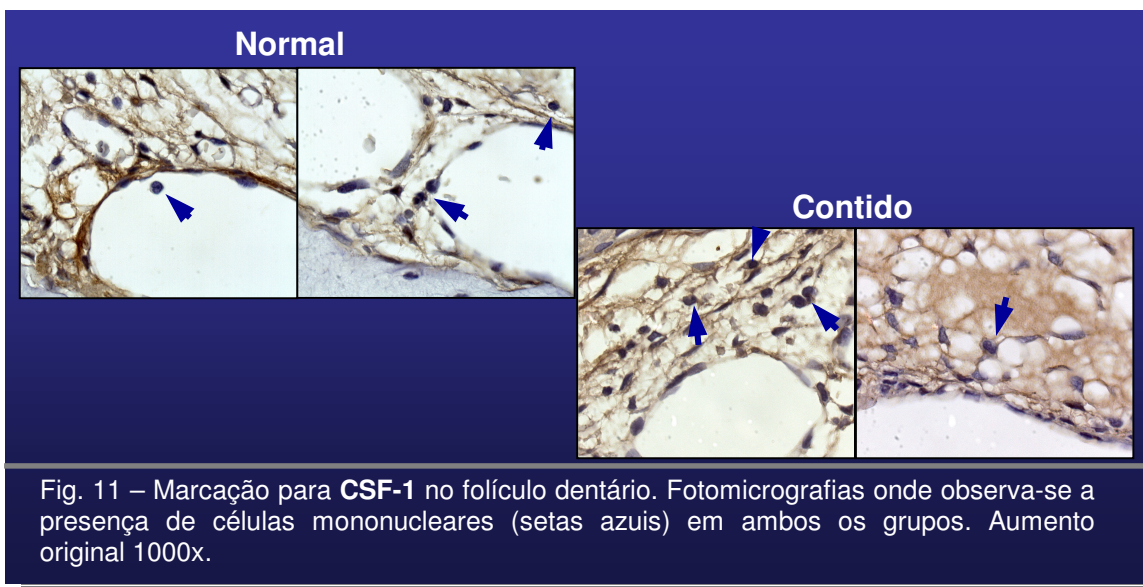
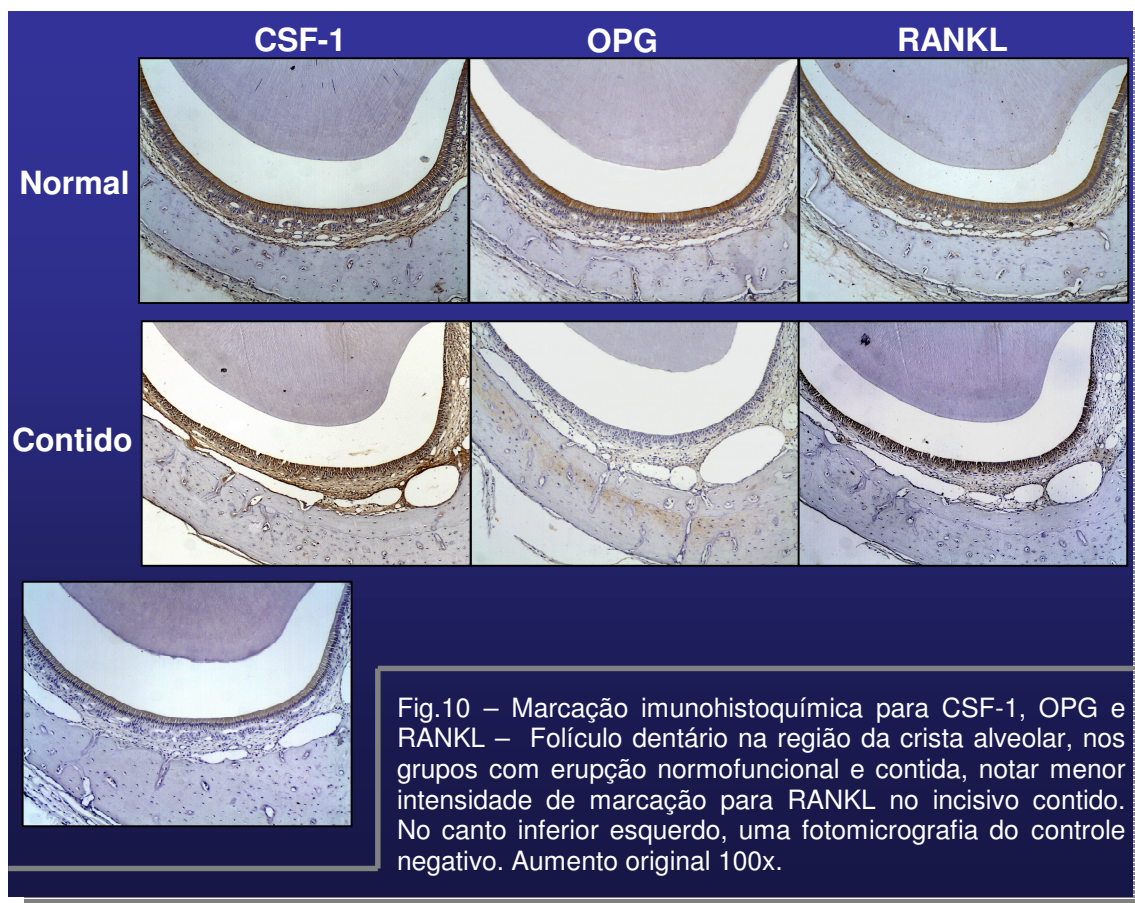


Fig. 9 – Reação histoquímica para Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP) – Observar nas figuras A e B a maior quantidade de osteoclastos no incisivo normofuncional e a inversão por osteoblastos no contido. A figura C ilustra dois osteoclastos na parte distal do OA em ambos grupos (seta), observar maior intensidade de marcação no osteoclasto do incisivo normal. A figura D ilustra duas fotomicrografias feitas na porção mesial do OA, observar no incisivo contido a presença de uma camada de osteoblastos (setas) demonstrando predominância de formação óssea nessa região.



5.4 Estruturas do osso alveolar

- **Osteócitos**

Observou-se a presença de osteócitos marcados e não-marcados, para OPG e RANKL, em ambos os grupos (Fig.13A, 13C e Fig.14A, 14C, respectivamente). Para CSF-1, a maioria dos osteócitos não apresentou marcação. Em ambos os grupos, esta estava presente somente em osteócitos novos (osteoblastos recém englobados pela matriz óssea) ou em zonas medulares presentes no osso (Fig.12A e Fig.12C).

- **Osteoclastos**

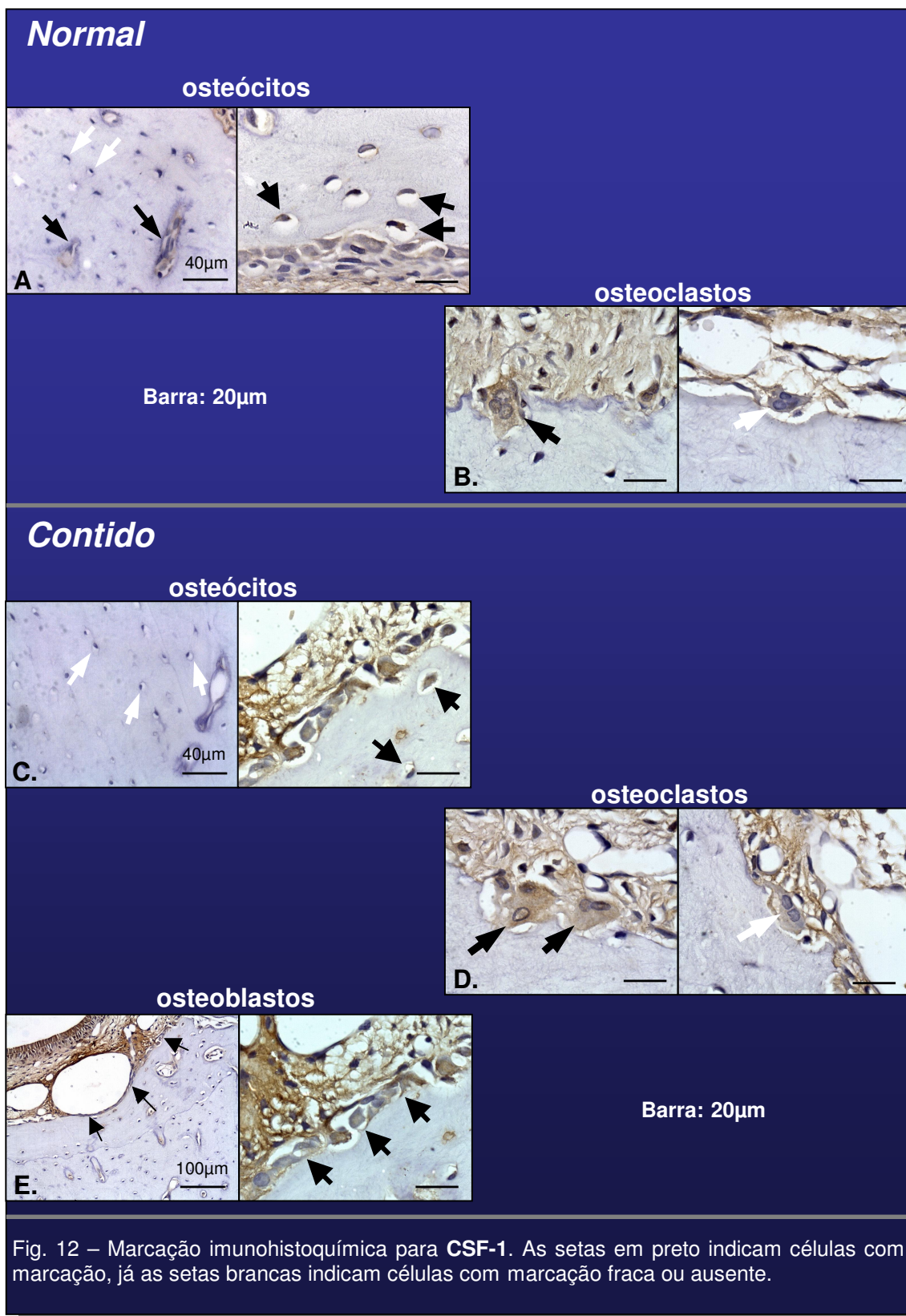
No grupo normofuncional os osteoclastos apresentaram-se marcados ou pouco marcados para todas as três proteínas estudadas (Figs.12B, 13B e 14B). No grupo contido o mesmo ocorreu com OPG e CSF-1 (Fig.12D e Fig.13D), porém, para RANKL a marcação em osteoclastos estava fraca ou ausente (Fig.14D).

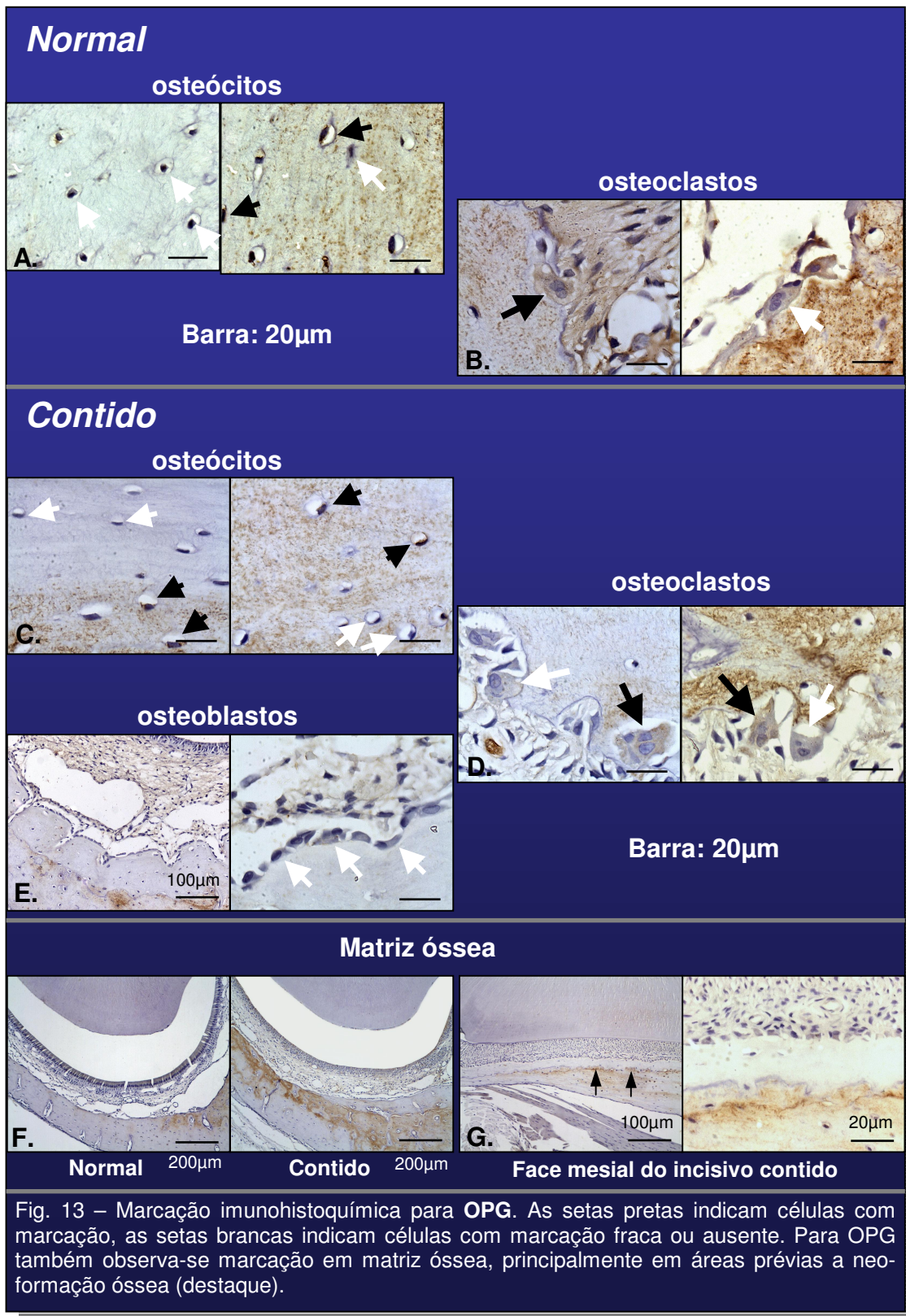
- **Osteoblastos**

Os osteoblastos adjacentes ao PRE que surgiram no grupo contido apresentaram-se com marcação fraca ou não-marcados para OPG e RANKL (Fig.13E e Fig.14E, respectivamente), porém apresentaram marcação de fraca à moderada para CSF-1 (Fig.12E).

- **Matriz óssea**

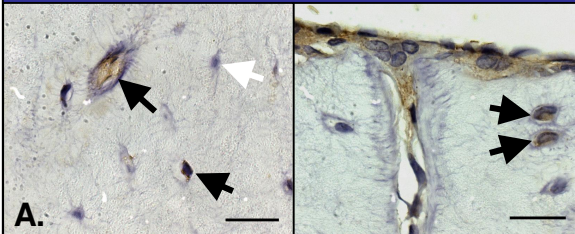
Marcação em matriz óssea foi observada somente para OPG (Fig.13F). A marcação estava presente em todos os animais de ambos os grupos e abrangia todas as intensidades (de fraca a intensa). No grupo contido observou-se que a marcação na matriz óssea predominou em áreas prévias a neoformação óssea, delimitadas pela presença de linhas de aposição (Fig.13G).



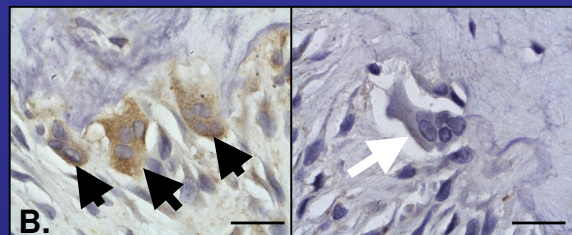


Normal

osteócitos



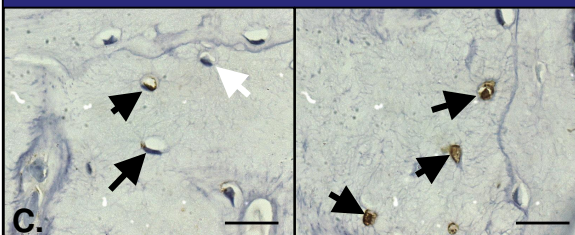
osteoclastos



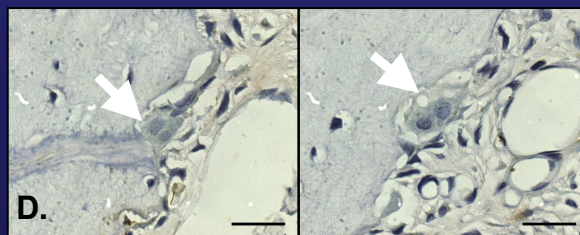
Barra: 20µm

Contido

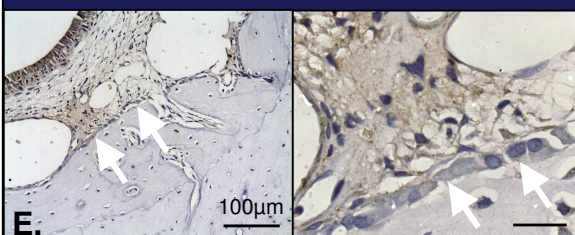
osteócitos



osteoclastos



osteoblastos



Barra: 20µm

Fig. 14 – Marcação imunohistoquímica para **RANKL**. As seta em preto indicam células com marcação, já as setas brancas indicam células com marcação fraca ou ausente.

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam que alterações no ambiente do folículo dentário influenciam as moléculas que participam da remodelação óssea.

O aspecto coronário do folículo dentário em molares e o tecido conjuntivo do PRE em incisivos de ratos são ambos relacionados à reabsorção óssea (Merzel *et al*, 2004). A reabsorção óssea e provavelmente a remodelação óssea promovida pelo folículo dentário são aparentemente necessárias para o crescimento e erupção do dente não somente na fase intraóssea (Gorski & Marks, 1992 apud Gerlach *et al*, 2002), mas também na fase supraóssea, a qual é continua em incisivos de roedores devido à presença de um órgão odontogênico funcionando continuamente (Merzel *et al*, 2000b). Quando a reabsorção óssea é prejudicada, a erupção é retardada ou interrompida, mas o crescimento pode mudar a direção ou se tornar anômalo como em dentes impactados (Merzel *et al*, 2004).

O impacto de forças na remodelação óssea é bem conhecido: pressão aumenta reabsorção enquanto tração aumenta formação (Gerlach *et al*, 2002). No caso do incisivo contido, segundo Salmon (2004), a instalação da contenção causou uma força inicial no sentido lingual promovendo uma inclinação do incisivo, que conduziu à expansão do PRE e compressão do ligamento periodontal na região mais próxima à crista alveolar. A expansão do PRE pode ter promovido redução das forças de compressão do tecido sobre a parede do alvéolo. Também, a contenção impediu os movimentos verticais do dente, reduzindo ou eliminando as forças de oclusão e do movimento eruptivo do dente sobre o alvéolo.

Em nível celular, o folículo dentário regula a osteoclastogênese necessária para a subsequente reabsorção do osso alveolar (Wise *et al*, 2006). No presente estudo, a quantidade de osteoclastos na superfície do osso alveolar na face labial reduziu drasticamente quando da contenção do incisivo. Associada a uma redução nas forças compressivas sobre a face labial do alvéolo houve uma diminuição significativa na intensidade de marcação para RANKL. A localização da

atividade osteoclástica pode ser mediada por uma cascata de moléculas de sinalização (Wise *et al*, 2002b; Heinrich *et al*, 2005). A presença de RANKL e CSF-1 é requerida para promover a osteoclastogênese (Wise *et al*, 2002b) enquanto OPG atua como um falso receptor para RANKL que inibe a formação de osteoclastos (Simonet *et al*, 1997).

CSF-1 parece ser indispensável para ambos, proliferação e diferenciação de precursores em osteoclastos (Tanaka *et al*, 1993), enquanto RANKL age induzindo diferenciação e ativação destes (Khosla, 2001). Camundongos *Knockout* para RANKL não apresentam deficiência de células mononucleares precursoras, porém tem quantidade reduzida de osteoclastos e apresentam dentes não erupcionados (Kong, 1999). A presença de células mononucleares foi observada no folículo dentário tanto de incisivos normofuncionais como nos contidos. Uma vez que no folículo dentário, em ambas as condições funcionais (normal e contida), não foi detectada nenhuma diferença significativa na intensidade de marcação para CSF-1, é esperado que células mononucleares, provavelmente precursoras de osteoclastos, estivessem presentes no folículo de incisivos contidos.

Heinrich *et al* (2005), avaliaram a expressão de mRNA de CSF-1, OPG e RANKL por meio de hibridização *in situ*, associada a atividade osteoclástica utilizando TRAP, em molares de camundongos de 1 a 14 dias após o nascimento. Na região oclusal, na fase intra-óssea, a atividade osteoclástica foi máxima no dia 5 e correlacionou com uma relativa alta expressão de CSF-1 e RANKL comparada a OPG. Na região basal, neste mesmo dia, a atividade osteoclástica diminuiu apesar de persistente expressão de CSF-1 e foi associada com uma maior expressão de OPG comparada a RANKL. O autor justificou a persistente presença de CSF à necessidade de estimulação de progenitores de osteoclastos requeridos para o normal *turnover* do osso.

Ao longo dos anos, vários trabalhos vêm elucidando os eventos celulares da erupção em molares de ratos e camundongos. Em primeiros molares de ratos, o maior pico na quantidade de osteoclastos ocorre no 3º dia pós-natal,

neste mesmo dia, CSF-1 é altamente expressado no folículo enquanto a expressão de OPG é diminuída (Wise *et al*, 2000). CSF-1 age para regular a expressão de OPG *in vivo* e a osteoclastogênese, neste determinado período, parece ocorrer como resultado de uma diminuição na expressão gênica de OPG por CSF-1 (Wise *et al*, 2005). Em nosso experimento, no folículo dentário de incisivos em ambos os grupos, não houve uma diferença estatisticamente significativa na intensidade de CSF-1, que correlacionou com uma indiferença também na intensidade de OPG.

Em estudo da expressão gênica de RANKL no folículo dentário de molares de ratos nos 11 primeiros dias de vida, os resultados mostraram que a expressão de RANKL foi significativamente elevada nos dias 9 a 11. Os autores relacionaram este resultado ao fato de que durante a erupção de molares ocorrem dois picos da osteoclastogênese: um maior no 3º dia de vida e um outro menor no 10º dia. Assim, o fato de que há somente um pequeno aumento na osteoclastogênese no dia 10 comparado com o aumento máximo observado no dia 3, é provavelmente devido ao fato de que os níveis de OPG são altos nos dias 9-11, mas baixos no 3º dia. Resumindo, a relação RANKL/OPG a favor da osteoclastogênese pode ser maior no 3º dia do que no 10º dia (Liu *et al*, 2005).

Em nosso experimento não foi detectada no folículo dentário, uma diferença significativa na intensidade de marcação para OPG entre os grupos. Devido ao fato do incisivo ser um dente que está em constante erupção e crescimento, proporcionalmente ao crescimento somático geral do animal (Harari *et al*, 2005), parece que os níveis de OPG no folículo dentário e ligamento periodontal destes dentes são baixos. Com a contenção do incisivo houve na região da crista uma diminuição de forças compressivas sobre o PRE e, devido à interrupção da erupção, a formação de novos tecidos dentais ocorreu em direção à basal, sendo que o diâmetro do dente na região incisal não aumentou, eliminando as forças de compressão causadas pelo crescimento normal (Salmon, 2004). Nos limites deste trabalho, onde a localização e quantificação das proteínas foram feitos por meio de imunohistoquímica, essas alterações no

incisivo contido levaram a uma modificação nos tecidos do PRE que correlacionaram com uma diminuição de RANKL no folículo dentário, sem alterar significativamente o nível de OPG. Para melhor esclarecer este fato, metodologias mais apuradas, como RT-PCR, seria de grande valor.

Simonet *et al* (1997) identificaram OPG como uma nova glicoproteína secretada que regula a reabsorção óssea. Esta glicoproteína foi descrita como um novo membro da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNFr), mas no entanto não continha nenhuma seqüência hidrofóbica transmembrana, agindo como uma glicoproteína solúvel secretada. Ratos ou camundongos transgênicos para uma super expressão de OPG possuem uma osteopetrose severa, porém não letal. Adicionalmente, estes animais possuem tamanho normal, ossos com formas normais e nenhum defeito aparente na erupção dental. Histologicamente, esses animais tem uma marcada redução em osteoclastos trabeculares, mas nenhuma deficiência em precursores de osteoclastos, sugerindo que a OPG e talvez seu ligante naturalmente servem para regular a densidade óssea através da modulação da diferenciação de osteoclastos a partir de precursores hematopoiéticos.

Injeções de OPG e PMA (phorbolmyristate acetate), um ativador da proteína kinase C que em troca aumenta a expressão de OPG, causaram um atraso de um dia na erupção de molares de ratos, de maneira dose-dependente (este atraso só foi conseguido com uma dose de 150ng/g de peso corporal), porém não houve diferença na erupção do incisivo (Wise *et al*, 2006). O autor justificou a não diferença na erupção do incisivo dizendo que a osteoclastogênese necessária para a erupção do incisivo poderia ser por uma via independente de RANKL, OPG e CSF-1, porém nossos resultados mostraram que uma diminuição na quantidade de osteoclastos no alvéolo de incisivos correlaciona com uma diminuição na intensidade da proteína RANKL, por meio de imunohistoquímica. Também, a erupção dental é um evento localizado e alterações sistêmicas nos níveis de OPG parecem não exercer influência sobre o processo de erupção.

OPG foi claramente evidenciada na matriz óssea em nosso trabalho. No grupo contido observou-se que a marcação na matriz óssea predominou em áreas prévias a neoformação óssea, delimitadas pela presença de linhas incrementais. Ratos deficientes em OPG possuem matriz óssea desorganizada e fixação prejudicada do osso recém-formado ao osso antigo em linhas de cimentação, que parecem causar uma fragilidade óssea nestes animais (Amizuka *et al*, 2003). Estudo realizado em tíbias de ratos localizou OPG, por meio de imunocitoquímica, em superfícies ósseas e linhas de cimentação. Partículas de ouro imunoreativas para OPG também foram localizadas na superfície óssea adjacentes à zona clara de osteoclastos (Nakamura *et al*, 2002). Esta localização indica uma provável ação preventiva e protetora de OPG contra a atividade de reabsorção dos osteoclastos.

Estudo examinou por meio de hibridização *in situ*, a expressão de mRNA de RANKL, RANK e OPG em osteoclastos do tecido periodontal de molares de ratos, em condições fisiológicas e após indução de reabsorção óssea por movimentação ortodôntica. Osteoclastos expressando RANK e RANKL, simultaneamente, foram vistos sob ambas as condições, porém nenhum osteoclasto positivo para OPG foi observado. RANKL e OPG também foram positivas em osteoblastos e células do ligamento periodontal. Quando excessiva força ortodôntica foi aplicada, houve uma mudança no número e no padrão de distribuição de osteoclastos expressando RANK e RANKL, porém nenhuma mudança no número de osteoblastos e células do ligamento periodontal positivos para OPG foi observada após o tratamento (Ogasawara *et al*, 2004). Segundo o autor, osteoclastos podem possuir uma via de ativação autócrina através da secreção de RANKL solúvel associada à secreção de RANK, pois RANKL induz uma maior atividade em osteoclastos e aumenta a sobrevivência destes através da inibição da apoptose em osteoclastos maduros (Fuller, 1998).

Em nosso estudo, também foram observados células positivas e negativas para CSF-1, RANKL e OPG nos tecidos periodontais do incisivo. Os osteoblastos e células conjuntivas (principalmente fibroblastos) apresentaram

marcação em maior ou menor intensidade. Já está comprovado que a presença destas células é indispensável para desencadear a osteoclastogênese (Khosla, 2001). Em ambas as condições funcionais observamos a presença de osteoclastos marcados para CSF-1 e OPG, alguns estavam marcados enquanto outros não. Esta marcação parece estar relacionada com o grau de atividade da célula. CSF-1 e RANKL são necessários para diferenciação, ativação e sobrevivência de osteoclastos maduros (Burgess *et al*, 1999). Nos incisivos contidos os osteoclastos apresentaram marcação fraca ou ausente para RANKL o que correlacionou com fraca marcação para TRAP nos osteoclastos do periodonto deste grupo. Osteoprotegerina, porém, não está relacionada à osteoclastos, mas existem relatos de marcação imunohistoquímica para OPG nestas células (Silvestrini *et al*, 2005). Hakeda *et al* (1998), detectaram na membrana plasmática de osteoclastos maduros isolados de coelho, uma proteína de ligação à OPG de 140 kDa. A ligação de OPG a esta proteína presente na membrana de osteoclastos, reduziu ou rompeu a formação de anéis de actina-F em osteoclastos isolados, uma estrutura citoesquelética a qual está correlacionada com a atividade de reabsorção óssea. Estes achados demonstram que a OPG pode diretamente inibir a função osteoclástica por meio de um mecanismo independente de RANKL.

O osso alveolar se remodela de acordo com as mudanças ocorrendo na morfologia do dente e do periodonto (Steigman *et al*, 1989). A fonte de moléculas regulatórias da osteoclastogênese para a reabsorção do osso alveolar é o folículo dentário (Wise *et al*, 2006). O folículo serve como um tecido alvo para atrair células mononucleares, serve como um repositório para as células e oferece um ambiente por meio do qual estas células podem se fundir para formar osteoclastos. Morfologicamente, por causa de o folículo dentário estar interposto entre o osso alveolar e o dente, ele possui uma localização ideal para regular os eventos celulares da erupção (Wise *et al*, 2002b) e da remodelação óssea em incisivos de crescimento contínuo.

Segundo Marks *et al* (1994), entender as contribuições da remodelação do osso alveolar para a erupção dental poderá gerar aplicações clínicas na

regulação farmacológica da erupção dental, do movimento dental e na estabilização de dentes decíduos retidos e de implantes dentais.

7 CONCLUSÃO

As moléculas estudadas estavam presentes no PRE, da região da crista de incisivos inferiores de ratos, em erupção normal e contida, sendo que na condição contida houve uma diminuição na intensidade de RANKL e da quantidade de osteoclastos. Diante desta observação, podemos concluir que alterações nos tecidos que compõem o PRE no incisivo contido, modificam a relação OPG/RANKL, na presença de CSF-1, alterando o metabolismo das células que participam da remodelação óssea.

REFERÊNCIAS*

Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, *et al.* The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol.* 1999; 145(3): 527-538.

Cahill D.R., Marks S.C.Jr. Tooth Eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J Oral Pathol.* 1980; 9: 189-200.

Cahill DR, Marks SCJr, Wise GE, Gorski JP. A review and comparison of tooth eruption systems used in experimentation—a new proposal on tooth eruption. In: Davidovitch, Z. editor. *The Biological Mechanisms of Tooth Eruption and Root Resorption.* EBESCO Media, Birmingham AL, 1988: 1–7. *apud* Gerlach R.F., Toledo D.B., Fonseca R.B., Novaes P.D., Lline S.R.P., Merzel J. Alveolar bone remodelling pattern of the rat incisor under different functional conditions as shown by minocycline administration. *Arch Oral Biol.* 2002; 47(3): 203-3.

Cole AA, Walters LM. Tartrate-resistant acid phosphatase in bone and cartilage following decalcification and cold-embedding in plastic. *J Histochem Cytochem.* 1987; 35(2): 203-206.

Das SK, Stanley ER. Structure-function studies of a colony stimulating factor (CSF-1). *J Biol Chem.* 1982; 257(22): 13679-13684.

Gerlach RF, Toledo DB, Fonseca RB, Novaes PD, Lline SRP, Merzel J. Alveolar bone remodelling pattern of the rat incisor under different functional conditions as shown by minocycline administration. *Arch Oral Biol.* 2002; 47(3): 203-3.

Gorski JP, Marks Jr SC. Current concepts of biology of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1992; 3: 185–206. *apud* Gerlach R.F., Toledo D.B., Fonseca R.B., Novaes P.D., Lline S.R.P., Merzel J. Alveolar bone remodelling pattern of the rat incisor under different functional conditions as shown by minocycline administration. *Arch Oral Biol.* 2002; 47(3): 203-3.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Grier IV R.L., Wise, G.E. Inhibition of tooth eruption in the rat by a bisphosphonate. *J Dent Res.* 1998; 77(1): 8-15.

Hakeda Y, Kobayashi Y, Yamaguchi K, Yasuda H, Tsuda E, Higashio K, *et al.* Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Bioch and bioph research communications.* 1998; 251: 796-801.

Harari D, Hermolin G, Harari O. The effect of age on morphology and eruption of the lower incisors in mature rats. *Arch Oral Biol.* 2005; 50: 953-95.

Iizuka T, Cielinski M, Aukerman SL, Marks SC Jr. The effects of colony-stimulating factor-1 on tooth eruption in the toothless (osteopetrotic) rat in relation to the critical periods for bone resorption during tooth eruption. *Archs Oral Biol.* 1992; 37(8): 629-636.

Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and their differentiation expression in bone and thymus. *Endocrinology.* 2001; 142: 1419-1426.

Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001; 142(12): 5050-55.

Kim N, Odgren PR, Kim DK, Marks SC Jr, Choi Y. Diverse roles of the tumor necrosis factor family member TRANCE in skeletal physiology revealed by TRANCE deficiency and partial rescue by a lymphocyte-expressed TRANCE transgene. *Proc Natl Acad Sci.* 2000; 97: 10905-10.

Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, *et al.* OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymphonode organogenesis. *Nature.* 1999; 397: 315-323.

Marks S.C. Jr. Pathogenesis of osteopetrosis in the rat: reduced bone resorption due to reduced osteoclast function. *Am J Anat.* 1973; 138(2): 165-89.

Marks S.C. Jr., Cahill D.R. Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. *Arch Oral Biol.* 1984; 29(4): 311-22.

Marks Jr SC, Cielinski MJ, Sundquist K, Wise GE, Gorski JP. The role of bone resorption in tooth eruption. *In: Davidovitch, Z, editor. The Biological Mechanisms*

of Tooth Eruption, Resorption and Replacement by Implants. Harvard Society for Advance of Orthodontics, Boston, 1994: 483-88.

Marks S.C.Jr., Schroeder H.E. Tooth eruption: Theories and Facts. The Anat Rec. 1996; 245: 374-393.

Merzel, J., Novaes, P.D., Furlan, S. A study of root-resected and root-transected rat incisors when eruption ceases, shortly before they are exfoliated from the socket. Archs. Oral Biol. 2000a; 45: 315-322.

Merzel J, Novaes PD, Furlan S. The effects of local trauma to the enamel-related periodontal tissues em the eruption of the rat incisor. Arch Oral Biol. 2000b; 45: 323-333.

Merzel J, Furlan S, Novaes PD. The effect of partial damage to the enamel-related periodontium combined with root resection on eruption of the rat incisor eruption. Arch Oral Biol. 2004; 49: 209-216.

Michaeli Y, Steigman S, Yitschaky M, Weinreb, Jr. The response of the fibroblast population in the periodontal ligament of rat incisors to altered eruption rates. J Periodont Res. 1986; 21: 86-94.

Moxhan BJ, Berkovitz BKB. Interactions between thyroxine, hydrocortisone and cyclophosphamide in their effects on the eruption of the rat mandibular incisor. Arch Oral Biol. 1983; 28(12): 1083-7.

Nakamura H, Tsuji T, Hirata A, Yamamoto T. Localization of osteoprotegerin (OPG) on bone surfaces and cement lines in rat tibia. J Histochem Cytochem. 2002; 50(7): 945-953.

Odgren PR, Kim N, Mackay CA, Mason-Savas A, Choi Y, Marks SCJr. The role of RANKL (TRANCE/TNFSF11), a tumor necrosis factor family member, in skeletal development: effects of gene knockout and transgenic rescue. Connect Tissue Res. 2003; 44: 264-271.

Que BG, Wise GE. Colony-stimulating factor-1 and monocyte chemotactic protein-1 chemotaxis for monocytes in the rat dental follicle. Archs Oral Biol. 1997; 42(12): 855-860.

Rosa-Ranal M, de la Cruz D A, Lorena-Rúbio Y, Larrea F. New paradigms in the regulation of bone metabolism. *Rev Invest Clin.* 2001; 53(4): 362-9.

Salmon C.R. Remodelação óssea do periodonto de incisivo de rato em erupção normal e alterada: estudo com marcadores fluorescentes. [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2004.

Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli F, Leopizzi M, Gualtieri N, Monnazzi P, *et al.* Detection of osteoprotegerin (OPG) and its ligand (RANKL) mRNA and protein in femur and tibia of the rat. *J Mol Hist.* 2005; 36: 59-67.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997; 18(89): 309-319.

Smith CE, Nanci A. A method for sampling the stages of amelogenesis on mandibular rat incisors using the molars as a reference for dissection. *Anat. Rec.* 1989; 225: 257–266. *apud* Gerlach RF, Toledo DB, Fonseca RB, Novaes PD, Lline SRP, Merzel J. Alveolar bone remodelling pattern of the rat incisor under different functional conditions as shown by minocycline administration. *Arch Oral Biol.* 2002; 47(3): 203-3.

Steigman S, Michaeli Y, Yitzhaki M, Weinreb M. A three-dimensional evaluation of the effects of functional occlusal forces on the morphology of the dental and the periodontal tissues of the rat incisor. *J. Dent. Res.* 1989; 68: 1269–1274.

Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T, Stanley R, *et al.* Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J. Clin. Invest.* 1993; 91: 257-263.

Walker RA. Quantification of immunohistochemistry – issue concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology.* 2006; 49: 406-410.

Wise GE, Lin F, Zhao L. Transcription and translation of CSF-1 in the dental follicle. *J Dent Res.* 1995; 74 (9): 1551-1557.

Wise GE Zhao L, Grier IV RL. Localization and expression of CSF-1 receptor in rat dental follicle cells. *J Dent Res.* 1997; 76(6): 1244-1249.

Wise GE, Lumpkin SJ, Huang H, Zhang Q. Osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor in tooth eruption. J Dent Res. 2000; 79(12): 1937-42.

Wise GE, Yao S, Zhang Q, Ren Y. Inhibition of osteoclastogenesis by the secretion of osteoprotegerin in vitro by rat dental follicle cells and its implications for tooth eruption. Arch Oral Biol. 2002a; 47: 247-254.

Wise GE, Frazier-Bowers S, D'Souza. Cellular, molecular and genetic determinants of tooth eruption. Crit Rev Oral Biol Med. 2002b; 13(4): 323-334.

Wise G.E., Ren Y., Yao S. Regulation of osteoprotegerin gene expression in dental follicle cells. J Dent Res. 2003; 82(4): 298-302.

Wise G.E., Ding D., Yao S. Regulation of secretion of osteoprotegerin in rat dental follicle cells. Eur J Oral Sci. 2004;112: 439-444.

Wise G.E., Yao S., Odgren P.R., Pan F. CSF-1 Regulation of osteoclastogenesis for tooth eruption. J Dent Res. 2005; 84(9): 837-41

Wise GE, Yao S, Liu D. Injections of osteoprotegerin and PMA delay tooth eruption. Clin Anat. 2006; 19: 19-24.

Yao S, Ring S, Henk WG, Wise GE. In vivo expression of RANKL in the rat dental follicle as determined by laser capture microdissection. Arch Oral Biol. 2004; 49: 451-456.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Kyoji Y, Kinosaki M, Mochizuki S, *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/ osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci. 1998; 95:3597-3602.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, *et al.* A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. Bone. 1999; 25: 109-113.



**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP**

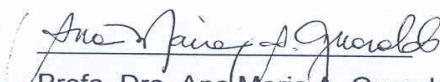
CERTIFICADO

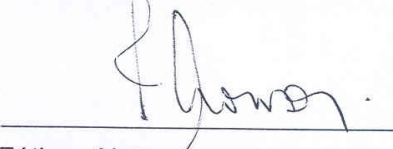
Certificamos que o Protocolo nº **1206-1**, sobre "**Imunolocalização de CSF-1, OPG e RANKL no periodonto de incisivos inferiores de ratos em erupção normal contida**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes / Juliana dos Santos Neves**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em 27 de fevereiro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1206-1**, entitled "**Immunolocalization of CSF-1, OPG and RANKL in periodontal tissue of normal and immobilized lower incisors rats**", 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 February 27, 2007.

Campinas, 27 de fevereiro de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva