UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CLÁUDIA CRISTINA BIGUETTI

**Papel das células CCR2+ no processo de
reparo ósseo alveolar em camundongos:
caracterização histomorfométrica e molecular**

BAURU
2014

CLÁUDIA CRISTINA BIGUETTI

Papel das células CCR2+ no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos: caracterização histomorfométrica e molecular

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração de Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

**BAURU
2014**

Biguetti, Cláudia Cristina

B488p Papel das células CCR2+ no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos: caracterização histomorfométrica e molecular / Cláudia Cristina Biguetti. – Bauru, 2014.
149 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-USP

Protocolo nº: 005/2012

Data: 27/03/2012

DEDICATÓRIA

Ao meu amor, **Hagner**.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, que me traz conforto espiritual e guia minhas escolhas.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet**, que me confiou este trabalho. Além da sua notável capacidade científica, honestidade e competência, o cuidado e a generosidade que naturalmente tem com cada um dos seus orientados permitiu que eu aproveitasse ao máximo este período acadêmico do mestrado. Minha gratidão pelo incentivo e apoio constantes que tem dado à minha formação.

Aos meus pais **Izildinha Rodriguez** e **Luiz Bigueti** (*in memoriam*). Minha mãe por sempre ter sido um exemplo de disposição, honestidade e fé. Por sempre ter dado o seu melhor para construção da minha dignidade. Ao meu pai, que enquanto presente, foi para mim uma referência de generosidade, humildade e trabalho.

Ao meu amor **Hagner Lúcio de Andrade**. Porque você me fez acreditar que eu poderia chegar até aqui, me mostrando o caminho com paciência e amor. Você é meu exemplo de inteligência, ética e determinação. Estendo meu agradecimento aos seus pais, **João** e **Isabel**, pelo carinho e orgulho que tem por mim.

Ao meu querido irmão **André Bigueti** e sua esposa **Sabrina Bigueti**, pelo amor e orgulho que nutrem por mim, bem como por todo apoio que me deram desde minha vinda para Bauru. E claro, pelo pequeno **Arthur**, que torna nossas vidas mais colorida.

À **Profa. Dra. Mariza Matsumoto**, uma amiga pela qual guardo grande estima e consideração, agradeço em primeiro lugar por ter me incentivado a trilhar os caminhos da pesquisa e por todos os seus conselhos. Sua amizade constante, seu exemplo de humildade e desprendimento, me incentivam a tentar ser uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

A todos da minha família, agradeço em nome dos meus queridos **avós Alvarindo e Izabel**, pelo amor e incentivo.

Aos queridos amigos dos tempos de faculdade **Régis Melo e Jaqueline Ap. Almeida**, que apesar da distância física, estiveram sempre presentes me incentivando em todos os momentos.

Aos queridos amigos **Cléber Peres e Paulo Venturini**, pelo incentivo, conselhos, torcida e amizade. Minha gratidão por terem feito parte da minha história, por contribuírem para minha formação, e por ainda me incentivarem mesmo distantes.

À querida **Antônia Dainesi (Dona Toninha)** e família agradeço o acolhimento e a consideração. Especialmente à Dona Toninha, obrigada pelo carinho e cuidado que tem comigo diariamente, por me ajudar em todas as horas, pelo incentivo e claro, pelos seus deliciosos quitutes.

À **Dra. Andreia Espíndola Vieira**, obrigada por ser uma amiga paciente e sempre muito prestativa, e em particular pelo seu apoio na realização das cirurgias e na calibração da análise histológica. Sua competência e humildade são admiráveis. Agradeço também, junto ao seu esposo **Francisnei Vieira**, pela consideração que ambos demonstram por mim.

Ao **Dr. Carlos Eduardo Repeke**, agradeço em primeiro lugar por todas as horas dedicadas à padronização da técnica exodôntica em camundongos juntamente com o **Ms. Samuel Ferreira**; um trabalho que exige paciência, conhecimento e muita destreza. Obrigada também pela sua amizade, bom humor, e pela disposição constante em ajudar nas cirurgias, o que foi fundamental durante a confecção deste trabalho, bem como de outros trabalhos do laboratório.

À **Dra. Élcia Silveira**, agradeço por contribuir indiretamente com a minha formação acadêmica, compartilhando comigo seus conhecimentos, sabedoria e experiências. Suas atitudes de desprendimento e humildade são exemplos para mim. Obrigada também pela sua amizade e bom humor diário que tornam nosso ambiente extremamente agradável.

À **Dra. Ana Cláudia Araújo-Pires**, que tem sido um exemplo de determinação. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos comigo de forma tão gentil, por ser uma amiga sempre muito disposta a ajudar, pelo apoio nas cirurgias e pelos conselhos diários.

À doutoranda **Carolina Favaro Franscisoni**, pela sua amizade e por todas as ajudas generosamente prestadas desde o início do meu mestrado, incluindo as cirurgias dos animais até nas disciplinas que cursamos juntas. Espero que ainda possamos desfrutar bons momentos durante a Pós-graduação.

Ao doutorando **Franco Cavalla**, agradeço em primeiro lugar pelas suas considerações na confecção dos resultados e pela sua ajuda na realização das cirurgias. Obrigada também pelo agradável convívio e amizade, bem como pela sua constante disposição em discutir biologia oral e física quântica. Aprendemos muito com você.

Às doutorandas **Bruna Barros Bighetti** e mestranda **Daniela Santos Pereira**, estimadas amigas, agradeço pelos bons momentos que dividimos durante as disciplinas, pelos agradáveis almoços e cafés, bem como pelo incentivo em ambas academias, científica e desportiva.

Aos Professores da **Histologia da FOB/USP**, **Dr. Gerson Francisco de Assis**, **Dr. Gustavo Pompermaier Garlet**, **Dr. Rumio Taga** e **Dra. Camila Rodini**. Agradeço por terem me recebido de braços abertos no laboratório, por participarem do meu crescimento profissional, pelo incentivo diário, bem como por todos os ensinamentos compartilhados.

À doutoranda **Carina Melo**, por ter me incentivado a seguir este caminho acadêmico desde a graduação. Obrigada por ser uma pessoa tão prestativa e se fazer uma amiga presente em todos os momentos.

Ao doutorando **Bruno Cavenago** da disciplina de endodontia, por toda colaboração prestada com as microtomografias deste e de outros trabalhos do nosso laboratório. Obrigada pela sua dedicação, paciência e gentileza.

À querida **Dra. Adriane Togashi**, sempre disposta a discutir e compartilhar seus conhecimentos comigo. Obrigada pela amizade e consideração.

À querida secretária **Teresa**, pelo seu admirável senso de dedicação e eficiência. Obrigada por me receber de braços abertos desde o início, por me ajudar a resolver todos os problemas burocráticos e não-burocráticos, pelas dicas de organização e pela sua alegria contagiante.

A todos os colegas do laboratório de Histologia, **Adriane, Ana Cláudia, Andreia, Bruna, Bruno, Carlos Eduardo (Cadu), Carolina Francisconi, Carolina Rocha, Daniela, Élcia, Ever, Franco, Gabriela, Paulinha, Priscila, Ricardo e Tamiris** por me receberem tão bem no laboratório, pelos agradáveis momentos de trabalho e descontração.

Às técnicas do laboratório de Histologia, **Danielle Ceollin, Patricia Germino e Dra. Tânia Cestari**. À **Danielle e Patricia**, agradeço especialmente pela dedicação, responsabilidade e capricho que tiveram com os procedimentos histológicos desta pesquisa. À **Dra. Tânia**, pelos ensinamentos prestados na análise de birrefringência, bem como pela sua disposição em discutir e ajudar. A todas, além da inestimável ajuda prestada neste trabalho, agradeço também pelo carinho e apoio durante o mestrado.

Aos demais professores do Departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP, sempre dedicados a melhorar a qualidade do ensino e pesquisa, obrigada pelo acolhimento e pelos ensinamentos recebidos.

E como não poderia esquecer, aos Professores que fizeram parte da minha graduação na **Universidade Sagrado Coração**, agradeço pelos ensinamentos e senso de profissionalismo que me transmitiram, permitindo que eu tivesse plenas condições de cursar o mestrado. Mesmo após 2 anos de formada, gostaria de agradecer o carinho e incentivo que constantemente dirigem a mim, especialmente aos **Profs. Drs. Aparicio Dekon, Claudia Piccino Sgavioli, Marco Antonio Hungaro Duarte, Mariza Akemi Matsumoto, Maria Cecília Veronezi, Patrícia Pinto Saraiva, Roberto Kawakami, Roberta Okamoto e Rodrigo Ricci Vivan**.

Muito Obrigada.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB)- USP**, representada pela digníssima Diretora **Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP**; pelo apoio financeiro concedido em forma de bolsa, fundamental para a realização do mestrado.

À **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) - USP**, em especial ao departamento de bioquímica e imunologia.

Muito Obrigada.

"This is your last chance. After this, there is no turning back. You take the blue pill - the story ends, you wake up in your bed and believe whatever you want to believe. You take the red pill - you stay in Wonderland and I show you how deep the rabbit-hole goes."

(Morpheus - The Matrix, 1999)

RESUMO

O processo de reparo ósseo depende de uma resposta inflamatória inicial e transitória, a qual envolve a participação de diversos leucócitos, como células da linhagem monócito/macrófago. O receptor CCR2 é importante para o recrutamento de macrófagos durante as respostas imunes, além de ter um papel na regulação da osteoclastogênese. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar papel de células CCR2+ no processo de reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos, por meio de análises microscópicas (MicroCT, histomorfometria, análise de birrefringência e imuno-histoquímica) e moleculares (PCRArray) comparativas entre as linhagens C57Bl/6 (WT) e CCR2KO, ao longo dos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia do incisivo superior direito. Como resultado geral das análises microscópicas, constatamos que a ausência de células CCR2+ não afetou o resultado final do reparo ósseo alveolar em camundongos CCR2KO, mas levou a alterações transitórias e estatisticamente significantes ($p < 0,05$) para quantificação de infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos, fibroblastos, fibras colágenas, osteoblastos e osteoclastos. Além disso, a ausência de células CCR2+ resultou em diminuição ($p < 0,05$) de células F4/80+ e CCR5+ no infiltrado inflamatório ao longo do processo de reparo ósseo alveolar de camundongos CCR2KO, demonstrando o papel do receptor CCR2 no recrutamento de macrófagos (células F4/80+), bem como sugerindo que as células F4/80+ apresentam dupla positividade para os receptores CCR2 e CCR5. Neste contexto, o receptor CCR5 seria o responsável pela migração remanescente, ainda que reduzida, de células F4/80+ nos animais CCR2KO. Considerando os resultados moleculares, a ausência de CCR2 resultou na alteração da expressão de diferentes marcadores em camundongos CCR2KO, tais como: o fator de crescimento TGF β 1, marcadores de matriz COL1, MMP1a, MMP2 e MMP9, marcadores ósseos RUNX2, DMP1, RANKL, RANK e CTSK, e marcadores de MSCs CD106, COT-4, NANOG, CD146 e CD105, bem como de marcadores imunológicos como as citocinas IL-6 e TNF- α , receptores de quimiocinas CCR1, CCR5 e CXCR1, e as quimiocinas CCL12, CCL20, CCL25 e CXCL12. Em conclusão, estes resultados indicam que células CCR2+ desempenham diferentes funções no reparo ósseo alveolar em camundongos, influenciando tanto a resposta inflamatória, como os eventos teciduais observados ao longo deste processo.

Palavras-chave: Tecido ósseo. Macrófagos. Células CCR2+. Alvéolo dental.

ABSTRACT

Role of CCR2+ cells in the alveolar bone repair process in mice: histomorphometric and molecular characterization

The bone repair process depends of an initial and transitory inflammatory response, which involves the participation of various leukocytes subsets, as of the monocyte/macrophage lineage. The CCR2 receptor is important to macrophage recruitment during immune responses, and play an active role in the regulation of osteoclastogenesis. Thereby, the purpose of this study was to investigate the role of CCR2+ cells in the alveolar bone repair process in mice, by means of microscopic (MicroCT, histomorphometry, birefringence analysis and immunohistochemistry) and molecular (PCRArray) comparative analysis between C57BL / 6 (WT) and CCR2KO mice during periods of 0 hour, 7, 14 and 21 days post-extraction of the right upper incisor. As a result of the microscopic analysis, we noted that the absence of CCR2+ cells did not affect in the overall outcome of alveolar bone repair in CCR2KO mice, but resulted in transient and statistically significant ($p < 0.05$) alterations of inflammatory infiltrate, blood vessels, fibroblasts, collagen fibers, osteoblasts and osteoclasts counts. Furthermore, the absence of CCR2+ cells resulted in a decrease ($p < 0.05$) of CCR5+ and F4/80+ cells in the inflammatory infiltrate along the alveolar bone repair process in CCR2KO mice, demonstrating the role of CCR2 receptor in macrophages migration (F4/80+ cells), as well as suggesting that the F4/80+ cells are double positive for CCR2 and CCR5. In this context, CCR5 receptor could be responsible for the remaining (but reduced) migration, of the F4/80 + cells in CCR2KO mice. According to molecular results, the absence of CCR2 resulted in an altered expression of different markers in CCR2KO mice, such as: growth factor TGF β 1, the matrix markers COL1, MMP1a, MMP2 and MMP9, the bone markers RUNX2, DMP1 RANKL, RANK and CTSK, and MSCs markers CD106, OCT-4, NANOG, CD146 and CD105, as well as immunological markers as IL-6 and TNF- α , chemokine receptors CCR1, CXCR1 and CCR5, and the chemokines CCL12, CCL20, CCL25 and CXCL12. In conclusion, these results indicate that CCR2+ cells have different functions in alveolar bone repair in mice, influencing the inflammatory response and also tissue events observed throughout the process events.

Keywords: Bone. Macrophage. CCR2+ cells. Dental socket.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Procedimento de exodontia do incisivo superior direito em camundongo. (a) camundongo da linhagem C57Bl/6-WT; (b) procedimento de descolamento da mucosa e luxação; (c) remoção do dente do alvéolo; (d) alvéolo pós-exodontia.....	43
Figura 2 -	Imagens tridimensionais das maxilas de camundongos da linhagem C57Bl/6-WT obtidas por renderização de volume no software CTvox	45
Figura 3 -	Representação esquemática da análise histomorfométrica. Em (a) retículo de integração (II ZEISS) sobreposto a um corte histológico formando um campo contendo 100 pontos equidistantes (10x10) e sua distribuição regular por 13 campos sobre o corte histológico em (b) , totalizando 39 campos nos 3 cortes histológicos do terço médio do alvéolo pós-exodontia	50
Figura 4 -	Exemplo do método de quantificação de fibras birrefringentes no alvéolo dental de camundongo WT aos 14 dias.....	52
Figura 5 -	Análise morfológica tridimensional por MicroCT (CTvox), do processo de reparo alveolar entre os grupos WT e CCR2KO nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia.	63
Figura 6 -	Análise histológica panorâmica do processo de reparo alveolar em camundongos WT e CCR2KO, nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia.	67
Figura 7 -	Análise histológica comparativa do processo de reparo alveolar em camundongos WT e CCR2KO, nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-exodontia	69
Figura 8 -	Análise histológica comparativa de detalhes do processo de reparo alveolar em camundongos WT e CCR2KO, nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-exodontia	71

Figura 9 -	Análise comparativa da densidade de área (%) de coágulo sanguíneo e outras estruturas presentes no alvéolo dental de camundongos WT e CCR2KO nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia.	74
Figura 10 -	Análise comparativa da densidade de área (%) de tecido conjuntivo (A) e de seus componentes (B-E) presentes no alvéolo dental de camundongos WT e CCR2KO nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia	77
Figura 11 -	Análise comparativa da densidade de área (%) de tecido ósseo (A) e de seus componentes (B-D) presentes no alvéolo dental de camundongos WT e CCR2KO nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia.	79
Figura 12 -	Análise de birrefringência das fibras colágenas presentes no alvéolo dental nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-exodontia, nos grupos WT e CCR2KO.	83
Figura 13 -	Análise quantitativa da área (pixels ²) ocupada por fibras colágenas birrefringentes no alvéolo dental nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-exodontia, nos grupos WT e CCR2KO	85
Figura 14 -	Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica para células CCR2+, F4/80+ e CCR5+ no período de 7 dias pós-exodontia, nos grupos WT e CCR2KO	87
Figura 15 -	Análise imuno-histoquímica para células CCR2+ presentes no alvéolo dental nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-exodontia no grupo WT	89
Figura 16 -	Análise imuno-histoquímica para células F4/80+ presentes no alvéolo dental nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-exodontia, em camundongos WT e CCR2KO	91
Figura 17 -	Análise imuno-histoquímica para células CCR5+ presentes no alvéolo dental nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-exodontia, no grupos WT e CCR2KO	93

Figura 18 - Análise quantitativa de células CCR2+ presentes no alvéolo dental do grupo WT aos 7, 14 e 21 dias pós-exodontia.	95
Figura 19 - Análise quantitativa de células F4/80+ presentes no alvéolo dental de camundongos WT e CCR2KO aos 7, 14 e 21 dias pós-exodontia.....	97
Figura 20 - Análise quantitativa de células CCR5+ presentes no alvéolo dental de camundongos WT e CCR2KO aos 7, 14 e 21 dias pós-exodontia.....	98
Figura 21 - Análise molecular do perfil geral da expressão gênica de marcadores de reparo no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos WT e CCR2KO	101
Figura 22 - Análise molecular do perfil geral da expressão gênica de marcadores imunológicos no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos WT e CCR2KO	102
Figura 23 - Análise molecular do perfil geral da expressão gênica de marcadores para MSCs no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos WT e CCR2KO	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tabela de contingência com o número de animais de cada grupo por período experimental e por procedimento de análise a ser realizado.....	42
Tabela 2 -	Relação dos genes analisados por PCRArray	57

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	Grau Celsius
µm	Micrômetro
kV	Kilovoltagem
uA	Microampere
3D	Tridimensional
Σ	Soma
ACTB	Beta-actina (<i>Beta-actin</i>)
AHSG	Alfa-2-HS-glicoproteína (<i>Alpha-2-HS-glycoprotein</i>)
Al	Símbolo químico do Alumínio
ALP	Fosfatase alcalina (<i>Alkalinephosphatase</i>)
AMBN	Ameloblastina (<i>Ameloblastin</i>)
B2m	Beta-2 microglobulina
BMP	Proteína Morfogenética Óssea (<i>Bone morphogeneticprotein</i>)
BSP	Sialoproteína Óssea
C57Bl/6-WT	Camundongo 57 black/6 (normal)
CA	Cortical Alveolar
CCL	Quimiocina da família CC
CCR	Receptor de quimiocina da família CC
CD	do inglês <i>cluster of differentiation</i> , indica marcadores de superfície
cDNA	DNA complementar
CEEPA	Comissão de Ética em Pesquisa com Animais
cm	Centímetro
COL1a2	Colágeno tipo I alfa 2 (<i>Collagentype I alpha 2</i>)
COL2a1	Colágeno tipo II alfa 1 (<i>Collagentype II alpha 1</i>)
COL4a2	Colágeno tipo IV alfa 2 (<i>Collagentype IV alpha 1</i>)
COL5a1	Colágeno tipo V alfa 1 (<i>Collagentype V alpha 1</i>)
COL-I	Colágeno do tipo I
CR	Célula de Revestimento
CS	Coágulo Sanguíneo
CT	do inglês “ciclethreshold”, traduzido como ciclo limiar

CTSK	Catepsina k (<i>Cathepsin K</i>)
CXCL	Quimiocina da família CXC
CXCR	Receptor de quimiocina da família CXC
Da	Densidade de área
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos (<i>Damage-associated molecular patterns</i>)
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DMP1	Proteína da matriz dentinária 1 (<i>Dentin matrix protein 1</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico.
EDTA	Ácido Tetracéticoetilenodiamino (<i>EthyleneDiamineTetraaceticAcid</i>)
EGF	Fator de Crescimento Epidermal (<i>Epidermalgrowthfactor</i>)
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme-linkedimmunosorbentassay</i>)
e-PTFE	Politetrafluoretileno expandido (<i>Expandedpolytetrafluorethylene</i>)
et al.	Colaboradores
F4/80	Marcador de macrófagos específico para camundongos
FMRP/USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto (<i>Fibroblastgrowthfactor</i>)
FOB/USP	Faculdade de Odontologia de Bauru / Universidade de São Paulo
g	Grama
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
Gusb	Beta-glucuronidase
H⁺	Íons ácidos
HE	Hematoxilina e Eosina (<i>Hematoxylinandeosin</i>)
HPRT1	Hipoxantina fosforibosiltransferase1(<i>Hipoxanthine phosphoribosyltransferase1</i>)
Hsp90ab1	do inglês <i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>
IFN	Interferon (<i>Interferon</i>)
IFN-γ	Interferon-gama (<i>Interferon</i>)
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina-I
IL	Interleucina (<i>Interleukin</i>)
IL-1β	Interleucina-1 beta
KO	Animal geneticamente modificado (<i>Knockout</i>)

mg/kg	miligramas por quilo
microCT	Microtomografia Computadorizada
min	Minuto
ml	Mililitros
mm	Milímetro
MMP	Metaloproteinase de matriz (<i>Matrix metalloproteinase</i>)
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro (<i>Messenger ribonucleic acid</i>)
MSC	do inglês <i>Mesenchymal Stem Cell</i> relativo à célula tronco mesenquimal
NES	Nestina, filamento de proteína positiva em células endoteliais em proliferação
NF-κB	Fator nuclear kappa B (<i>Nuclear factor kappa B</i>)
nm	Nanômetro
OBL	Osteoblasto
OCN	Osteocalcina
ON	Osteonectina
OPN	Osteopontina
OPG	Osteoprotegerina (<i>Osteoprotegerin</i>)
p	Nível de significância, probabilidade
P	Número total de pontos existentes no retículo
PBS	Solução Salina tamponada com fosfato (<i>Phosphatebuffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico.
PHEX	Endopeptidase neutra reguladora de fosfato (<i>Phosphateregulating endopeptidase homolog, X-linked</i>)
Pi	Estruturas consideradas
RANK	Receptor ativador do NF-κB (<i>Receptor activator of NF-κB</i>)
RANKL	Ligante do receptor ativador do NF-κB (<i>Receptor activator of NF-κB</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico
RGB	Red, Green e Blue - sistema de composição de cores
RUNX2	do inglês "Runt-related transcription factor 2" traduzido como fator de transcrição relacionado ao Runt 2, também conhecido como fator nuclear de ligação da subunidade alfa-1

s	Segundo
SERPINE1	Inibidor de Serino-proteases (<i>Serine protease inhibitor</i>)
SOST	Esclerostina (<i>Sclerostin</i>)
TBS	Tampão Fosfato Salino
TC	Tecido Conjuntivo
TG	Tecido de Granulação
TGF-β	Fator de crescimento e transformação beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
TIMP	Inibidor Tecidual de Metaloproteinase (<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>)
TLR	Receptores semelhantes atoll (<i>Toll-like receptors</i>)
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral (<i>Tumor necrosis factor alpha</i>)
TRAP	do inglês <i>Tartrate-resistant acid phosphatase</i> - enzima Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato
Treg	refere-se à células T reguladora
TWIST1	Proteína Twist 1 (<i>Twist-related protein 1</i>)
VDR	Receptor de vitamina D (<i>Vitamin D receptor</i>)
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
VS	Vasos Sanguíneos
WT	Camundongo normais (sem alteração, “tipo selvagem” - <i>Wild-type</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2	PROPOSIÇÃO	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	41
3.2	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	42
3.3	COLETA DAS AMOSTRAS	43
3.4	ANÁLISE DESCRITIVA POR MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (MicroCT)	44
3.5	PROCEDIMENTOS HISTOTÉCNICOS	47
3.6	ANÁLISES HISTOLÓGICAS DESCRITIVA E HISTOMORFOMÉTRICA	47
3.6.1	Análise histológica descritiva	48
3.6.2	Análise histomorfométrica	48
3.7	ANÁLISE DE BIRREFRINGÊNCIA	50
3.7.1	Método de polarização com Picrosirius Red	50
3.7.2	Quantificação das fibras birrefringentes	51
3.8	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	52
3.8.1	Seleção dos anticorpos primários.....	52
3.8.2	Protocolo de imunomarcção	53
3.8.3	Quantificação de células imunomarcadas.....	54
3.9	EXTRAÇÕES DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA	55
3.10	REAÇÕES DE PCRArray.....	56
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
4	RESULTADOS	59
4.1	ANÁLISE DESCRITIVA POR MicroCT DO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR PÓS-EXODONTIA EM CAMUNDONGOS WT E CCR2KO	61
4.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA DO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR PÓS-EXODONTIA EM CAMUNDONGOS WT E CCR2KO	65

4.3	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA COMPARATIVA DO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR PÓS-EXODONTIA EM CAMUNDONGOS WT E CCR2KO	73
4.3.1	Densidade de área de coágulo sanguíneo e outras estruturas durante o reparo alveolar em camundongos WT e CCR2KO	73
4.3.2	Densidade de área de tecido conjuntivo durante o reparo alveolar em camundongos WT e CCR2KO	74
4.3.3	Densidade de área de tecido ósseo durante o reparo alveolar em camundongos WT e CCR2KO	78
4.4	ANÁLISE DE BIRREFRINGÊNCIA DA MATRIZ COLAGENOSA DURANTE O REPARO ÓSSEO ALVEOLAR PÓS-EXODONTIA, EM CAMUNDONGOS WT E CCR2KO	80
4.5	CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS DURANTE O PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR PÓS-EXODONTIA EM CAMUNDONGOS WT E CCR2KO	86
4.5.1	Cinética de recrutamento de células CCR2+ durante o reparo alveolar pós-exodontia em camundongos WT	95
4.5.2	Cinética de recrutamento de células F4/80+ durante o processo de reparo alveolar pós-exodontia em camundongos WT e CCR2KO	95
4.5.3	Cinética de recrutamento de células CCR5+ durante o processo de reparo alveolar pós-exodontia em camundongos WT e CCR2KO	97
4.6	ANÁLISE MOLECULAR: PERFIL GERAL DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS MARCADORES ENVOLVIDOS NO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS WT E CCR2KO	98
5	DISCUSSÃO	105
6	CONCLUSÕES	123
	REFERÊNCIAS	127
	APÊNDICE	143
	ANEXO	147

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O tecido ósseo, um tipo de tecido conjuntivo especializado, constitui um componente essencial do sistema esquelético, formando os ossos e conferindo a essas estruturas importantes funções, tais como: suporte, auxílio na movimentação e locomoção, proteção de órgãos vitais, alojamento da medula óssea, além servir como um reservatório de cálcio e fosfato ao organismo. Tal capacidade multifuncional deste tecido está diretamente relacionada com as características da sua matriz mineralizada, cuja integridade é mantida pela atividade coordenada de células ósseas especializadas (osteoblastos, osteoclastos e osteócitos) (TAKAYANAGI, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011).

Em relação à composição da matriz óssea, sabe-se que 65% do seu peso é constituído por material inorgânico, 20% de matriz orgânica e 15% de água, de modo que as propriedades mecânicas características do tecido ósseo dependem da adequada combinação desse conjunto (KATCHBURIAN; ARANA, 2012). Cerca de 90% do total da matriz orgânica é constituído por colágeno do tipo I (COL1), cuja organização das fibras contribuem consideravelmente para a qualidade das suas propriedades mecânicas. Os outros 10% da matriz orgânica são relativos a proteoglicanas, proteínas reguladoras da mineralização e maturação da matriz (osteocalcina [OCN], sialoproteína óssea [BSP], osteopontina [OPN] e osteonectina [ON]), e fatores de crescimento que tornam-se incorporados à mesma durante sua síntese por osteoblastos, como por exemplo as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) e o fator de crescimento transformante- β (TGF- β). Já sua porção inorgânica é composta por um depósito de cálcio e fosfato altamente organizado em forma de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, cujos cristais são envoltos por uma capa de hidratação, restando uma pequena quantidade de outros íons como magnésio, potássio, bicarbonato e sódio (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; KATCHBURIAN; ARANA, 2012; NANJI, 2013).

Conforme citado, a matriz óssea (particularmente a porção orgânica) é sintetizada por osteoblastos, os quais são células mononucleadas de origem mesenquimal. Sob diferentes situações (desenvolvimento, remodelação e

reparação), células tronco mesenquimais (MSCs) se diferenciam em osteoblastos sob o controle fundamental dos fatores de transcrição RUNX2 (runt-related transcription factor 2) e OSTERIX, e de diferentes fatores como as BMPs e o TGF- β (TAKAYANAGI, 2007; ERIKSEN, 2010; NANCI, 2013). Após diferenciado e ativo, o osteoblasto exerce as seguintes funções: sintetiza a porção orgânica da matriz óssea (matriz osteoide enquanto não mineralizada); regula a mineralização da matriz por meio da síntese de fosfatase alcalina (ALP), altamente expressa também em pré-osteoblastos, e de outras proteínas já citadas (OCN, OPN, BSP e ON); secretam fatores de crescimento com função autócrina e parácrina (BMPs, fator de crescimento de fibroblastos - FGF, TGF- β , entre outros); e ainda controlam a diferenciação e ativação de osteoclastos, por meio da síntese de osteoprotegerina (OPG) e do ligante do receptor de ativação do fator nuclear kappa-B (RANKL) (ERIKSEN, 2010; LORENZO et al., 2011; NANCI, 2013). Cessada a deposição ativa da matriz óssea, os osteoblastos que permanecem na superfície podem ter dois potenciais destinos: ou entram em estado quiescente e passam a revestir a matriz óssea, sendo denominados células de revestimento, ou sofrem morte por apoptose (MANOLAGAS, 2000). Já outros osteoblastos, incorporados na matriz durante o processo de deposição, diferenciam-se em osteócitos, passando por importantes alterações morfológicas e funcionais (BONEWALD, 2011; DALLAS; PRIDEAUX; BONEWALD, 2013).

Durante a transição de osteoblastos para osteócitos, ocorre uma drástica diminuição do volume celular, e a formação de processos dendríticos (ao final 40-100 por célula) que se estendem através de um sistema canalicular no interior da matriz, promovendo o acesso dos osteócitos aos vasos sanguíneos, bem como a comunicação dessas células entre si e com células ósseas presentes na superfície (KNOTHE et al., 2004; FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006; DALLAS; PRIDEAUX; BONEWALD, 2013). Além disso, na medida em que os osteócitos se diferenciam, passam a expressar marcadores característicos como DMP1 (fosfoproteína ácida da matriz dentinária-1) e PHEX (do gene regulador do fosfato com homologia às endopeptidases), os quais parecem ter um papel crítico na homeostasia do fosfato, e SOST (gene *sclerostin*, o qual codifica a proteína esclerostina), que indica o estágio terminal de diferenciação do osteócito, estando possivelmente envolvido na inibição da formação óssea (DALLAS; PRIDEAUX;

BONEWALD, 2013). Atualmente, acredita-se que os osteócitos sejam células altamente versáteis, podendo regular a frente de mineralização da matriz logo após sua incorporação na mesma, e quando totalmente diferenciadas, remodelar a matriz óssea perilacunar, captar estímulos mecanosensoriais e surpreendentemente, coordenar os processos remodelação (reabsorção e seguida de formação óssea), por meio de sinais bioquímicos e moleculares transmitidos a osteoblastos e osteoclastos (ERIKSEN, 2010; BONEWALD, 2011; DALLAS; PRIDEAUX; BONEWALD, 2013; NANJI, 2013).

Os osteoclastos são células móveis e multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea, e são derivadas de um precursor da linhagem de monócitos/macrófagos, tendo portanto origem hematopoiética. Um dos principais sinais para a osteoclastogênese é mediado pela ligação de RANKL, produzido por osteoblastos, com o seu receptor RANK (receptor de ativação do fator nuclear kappa-B), presente na membrana celular tanto de precursores como de osteoclastos já diferenciados (TEITELBAUM, 2000; DUONG; RODAN, 2001; TAKAYANAGI, 2007). A ligação de RANK com RANKL desencadeia a ativação do fator de transcrição NFkB, necessário também para ativação destas células. Entretanto, como citado anteriormente, osteoblastos também secretam OPG, que atua como um receptor "*decoy*" para RANKL, impedindo sua ligação com RANK e consequentemente regulando a reabsorção óssea (DUONG; RODAN, 2001; TAKAYANAGI, 2007; ERIKSEN, 2010; NANJI, 2013).

Para que o osteoclasto promova a reabsorção óssea, tal célula deve inicialmente se fixar à matriz óssea por meio de zonas de vedação, desenvolvendo posteriormente uma superfície ativa da membrana voltada para matriz (ou borda pregueada) no interior da área vedada (VÄÄNÄNEN et al., 1998; DUONG; RODAN, 2001). Em seguida, a célula gera um microambiente ácido (pH 4,5) na região vedada, onde inicialmente ocorre a dissolução dos componentes inorgânicos da matriz, seguida da exposição e subsequente degradação do conteúdo orgânico por proteases, formando uma lacuna de reabsorção (lacuna de Howship) (VÄÄNÄNEN et al., 1998; TEITELBAUM, 2000; DUONG; RODAN, 2001; KATCHBURIAN; ARANA, 2012; HIRVONEN et al., 2013). Enzimas produzidas por osteoclastos nesta fase de degradação da matriz, tais como catepsina K (CTSK), metaloproteases da matriz (MMPs) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), são também utilizadas

como característicos e importantes marcadores dessas células (ANDRADE et al., 2009; TADDEI et al., 2012; FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013).

Dadas estas breves características celulares e moleculares do tecido ósseo, observa-se que embora tenha um aspecto macroscópico aparentemente inerte, as interações que ocorrem no seu microambiente tornam este tecido metabolicamente muito dinâmico e com alta capacidade de remodelação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ERIKSEN, 2010). A remodelação óssea consiste em um processo altamente equilibrado, no qual deve ocorrer reabsorção seguida de neoformação óssea nas mesmas proporções (*"coupled bone formation"*), permitindo a renovação do tecido ósseo sem que haja alterações funcionais. Assim, o desenvolvimento, a homeostasia, e a capacidade de reparo do tecido ósseo dependem do balanço dinâmico entre estes dois eventos (TAKAYANAGI, 2007; DATTA et al., 2008; ERIKSEN, 2010), os quais ainda podem ser influenciados por diversos fatores locais e sistêmicos (que também incluem fatores genéticos, da dieta, e de estímulos provenientes da atividade física), com destaque para a recente associação do sistema imunológico com o sistema esquelético, em uma nova vertente de pesquisa denominada osteoimunologia (HOROWITZ et al., 2001; DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; TAKAYANAGI, 2005; WADA et al., 2006; TAKAYANAGI, 2007; AL-AQL et al., 2008; BEHL et al., 2008; HERMAN; KRONKE; SCHETT, 2008; FUKUMOTO; MARTIN, 2009; NICKS et al., 2009; ERIKSEN, 2010; LORENZO et al., 2011).

Tal associação foi identificada inicialmente no estudo da artrite reumatóide, patologia na qual a manutenção de um processo inflamatório crônico leva à reabsorção óssea articular, em um processo que, em termos moleculares e patológicos, mostra-se similar ao verificado na perda óssea associada à periodontite, cuja imunopatogênese tem sido alvo de estudo de nosso grupo de pesquisa nos últimos anos (GARLET, 2004; GARLET et al., 2004; GARLET et al., 2006a; 2006b; GARLET et al., 2007a; SILVA et al., 2007; GARLET et al., 2008a; CARDOSO et al., 2009; de OLIVEIRA et al., 2009; TROMBONE et al., 2009; REPEKE et al., 2010). Tais estudos demonstram que a conexão entre os sistemas imunológico e ósseo baseia-se na interferência no processo de remodelação óssea pelos mediadores produzidos pelas células do sistema imune: enquanto mediadores inflamatórios inibem a atividade dos osteoblastos e potencializam a atividade dos osteoclastos,

mediadores anti-inflamatórios apresentam efeito oposto (GARLET et al., 2006a, 2006b; GARLET et al., 2007a). O melhor exemplo já caracterizado de tal interação é a produção de RANKL por linfócitos T ativados, que desequilibra o balanço entre RANKL e OPG, normalmente mantido sob estrito controle pelos osteoblastos. De fato, a interferência de leucócitos e seus produtos sobre a regulação do sistema RANK/RANKL/OPG pode influenciar de forma decisiva a homeostasia do tecido ósseo (TEITELBAUM, 2000; KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; GARLET et al., 2006a, 2006b; WADA et al., 2006; TAKAYANAGI, 2007; HERMAN; KRONKE; SCHETT, 2008; LORENZO et al., 2011).

Diante dos estudos realizados no campo da osteoimunologia, nota-se que embora os resultados sejam promissores, com aplicação terapêutica e diagnóstica em diferentes áreas da medicina e odontologia, os estudos têm se concentrado na influência de células e mediadores imunológicos no processo de reabsorção óssea, sobretudo em situações patológicas, com modelos de artrite reumatóide, mieloma e doença periodontal (GOLDRING, 2000; THEILL; BOYLE; PENNINGER, 2002; AGGARWAL; GHOBRIAL; ROODMAN, 2006; GARLET et al., 2006a, 2006b; GARLET et al., 2007a; LI et al., 2007; ANG et al., 2009; WALSH; GRAVALLESE, 2010; GRAVES; OATES; GARLET, 2011; GLOWACKI et al., 2013). Um ponto comum a estes modelos é que os mesmos não permitem o estudo da possível influência do sistema imunológico na formação óssea subsequente à reabsorção (*coupled bone formation*), tanto por motivos técnicos (tais como o tamanho das peças e lesões), quanto pela natureza patológica dessas lesões, cujo processo inflamatório crônico limita o processo de reparo/regeneração do tecido ósseo nestas condições (GRAVES; OATES; GARLET, 2011; THOMAS; PULEO, 2011; GLOWACKI et al., 2013).

Sabe-se que em condições homeostáticas de reparo, ocorre a instalação inicial de um processo inflamatório moderado e transitório, o qual diminui a medida em que o processo de reparo progride com a formação de um tecido de granulação, diferenciação de células ósseas e produção de matriz mineralizada, resultando finalmente na completa neoformação óssea (DAVIES, 2003; RODRIGUES, 2007; CARDOSO, 2009; POLETI, 2009; CARDOSO et al., 2010). Como uma etapa essencial, tem sido demonstrado que a reação inflamatória controlada durante o início do reparo resulta em uma liberação/secreção sequencial de diferentes BMPs, fatores de crescimento, mediadores inflamatórios e citocinas, os quais em conjunto

são responsáveis por mediar o reparo ósseo adequadamente (MOUNTZIARIS; MIKOS, 2008; THOMAS; PULEO, 2011), indicando um papel fundamental de células e fatores do sistema imunológico neste processo.

Dessa forma, como uma alternativa para investigar os mecanismos regulatórios do sistema imunológico sobre o tecido ósseo, adaptamos em nosso laboratório um modelo de reparo ósseo alveolar pós-exodontia de incisivos caracteristicamente utilizado em ratos (OKAMOTO; de RUSSO, 1973; RODRIGUES, 2007; CARDOSO, 2009; POLETI, 2009), para sua aplicação em camundongos (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013), uma vez que tal espécie permite a modificação genética para ausência da expressão de um determinado alvo (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013). De fato, com a possibilidade da geração de camundongos KO (*knockouts*, ou geneticamente deficientes) para um determinado fator, é possível investigar o papel específico de tal molécula em um determinado fenótipo ou evento biológico, por meio da comparação com os mesmos eventos ou com o fenótipo observado em camundongos WT, considerados neste caso um controle (KORPI et al., 2009; TOMOMATSU et al., 2009).

Considerando a padronização do modelo proposto, resultados prévios da caracterização do reparo ósseo alveolar em camundongos WT (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013), demonstraram inicialmente que tal processo apresenta a mesma sequência de eventos teciduais previamente descrita em humanos e ratos (BODNER et al., 1993; ELSUBEIHI; HEERSCHE, 2004; RODRIGUES, 2007; CARDOSO, 2009; POLETI, 2009) com uma variação na cronologia, característica do rápido metabolismo murino (BODNER et al., 1993; WITTE; BARBUL, 1997; ELSUBEIHI; HEERSCHE, 2004; KORPI et al., 2009). Dessa forma, imediatamente após a exodontia, nota-se a formação de um coágulo sanguíneo no interior do alvéolo, que ao longo do tempo sofre invasão de células inflamatórias. À medida que o coágulo é reabsorvido, um tecido conjuntivo de granulação rico em vasos sanguíneos se estabelece no local (ELSUBEIHI; HEERSCHE, 2004; RODRIGUES, 2007; CARDOSO, 2009; POLETI, 2009; FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013). Na sequência, tal tecido é gradativamente substituído por uma matriz osteoide ativamente formada por osteoblastos. Quando mineralizada, tal matriz forma as trabéculas ósseas primárias, as quais ainda são na sequência remodeladas, dando origem a um tecido ósseo maduro e mais resistente (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA,

2013; ELSUBEIHI; HEERSCHKE, 2004; RODRIGUES, 2007; CARDOSO, 2009; POLETI, 2009). Na fase final do processo de reparo, o alvéolo encontra-se completamente preenchido por tecido ósseo permeado por tecido medular. Em humanos isto ocorre por volta do sétimo mês (210 dias) após a exodontia (CARVALHO; OKAMOTO, 1987), o que em camundongos equivale a 21 dias (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013).

Ainda, tal padronização prévia demonstrou a expressão de diferentes fatores moleculares presentes durante o processo de reparo ósseo alveolar em camundongos WT, tais como: a enzima iNOS (responsável pela produção do mediador inflamatório óxido nítrico [NO]); fatores de crescimento como diferentes BMPs (BMP-2, BMP-4, BMP-7), TGF- β e VEGF (fator de crescimento vascular endotelial); marcadores de osteoblastos (RUNX2, ALP E OCN), de osteócitos (DMP1, PHEX, SOST) e de osteoclastos (RANKL, OPG, RANK, CTSK,); marcadores de matriz, como metaloproteases (MMP-1a, MMP-2, MMP-9), seus inibidores Tempó (TIMP1, TIMP3), e diferentes tipos de colágeno (COL1A2, COL2A1); citocinas como IL1 β (interleucina1 beta), IL6 (interleucina- 6), TNF- α (fator de necrose tumoral- α) e IL-10 (interleucina-10); além de diferentes receptores de quimiocinas (CCR1, CCR2, CCR5) e quimiocinas (CCL2, CCL7, CCL9, CCL17, CCL20 E CXCL3) (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013).

Com essa padronização inicial, estes trabalhos não só demonstraram os diferentes fatores moleculares expressos durante o reparo ósseo alveolar em camundongos, como também melhoraram o entendimento dos mecanismos regulatórios do sistema imunológico sobre o reparo ósseo por meio da comparação do reparo da linhagem WT com o padrão de reparo observado nas linhagens TNFp55KO, IL10KO (VIEIRA, 2013) e iNOSKO (FRANCISCONI, 2013). Adicionalmente, tais trabalhos chamaram a atenção para uma alta expressão do receptor CCR2 ao longo do processo de reparo alveolar em camundongos WT, e do seu ligante CCL2 (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013), tornando oportuna a investigação do papel de células CCR2+ durante o processo de reparo alveolar pós-exodontia, foco deste trabalho.

As quimiocinas compreendem uma superfamília de citocinas quimiotáticas e são os principais fatores envolvidos no recrutamento de leucócitos, promovendo a ativação de integrinas envolvidas na adesão dos leucócitos a células endoteliais e

gerando gradientes quimiotáticos nos tecidos (BOKOCH, 1995; GRAVES; JIANG, 1995; SOZZANI et al., 1996; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Assim, quimiocinas são responsáveis pelo direcionamento da migração celular e pela sua manutenção nos tecidos (BOKOCH, 1995; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Diferentes tipos de quimiocinas têm sido identificadas e classificadas em distintas famílias, compreendendo ao todo quatro grupos: CC, CXC, C e CX3C (GRAVES; JIANG, 1995; ROSSI; ZLOTNIK, 2008), as quais atuam em receptores celulares específicos cuja nomenclatura se dá pelo acréscimo da letra R ao final do nome da classe de quimiocinas que o receptor se liga, a exemplo da quimiocina CCL2 - principal ligante do receptor CCR2 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; MURRAY; WYNN, 2011). Sabe-se ainda que a expressão seletiva de quimiocinas e dos seus respectivos receptores é um fator crucial para a determinação da especificidade da migração celular (MANTOVANI, 1999; ROSSI; ZLOTNIK, 2008).

Neste sentido, estudos prévios indicam que particularmente o eixo CCR2/CCL2 tem sido predominantemente associado ao recrutamento e ativação de monócitos/macrófagos para diferentes sítios de inflamação, sendo CCR2 considerado um receptor clássico dessas células, embora nem todos os monócitos/macrófagos o expressem (KURIHARA et al., 1997; CONTI; DIGIOACCHINO, 2001; GEISSMANN; JUNG; LITTMAN, 2003; TACKE et al., 2007; RIGAMONTI et al., 2009; AIELLO et al., 2010). Cabe ressaltar que monócitos/macrófagos são em geral identificados nos tecidos de camundongos por meio do marcador característico F4/80 (MULLER, 2001; GEISSMANN; JUNG; LITTMAN, 2003; CHANG et al., 2008; WINKLER et al., 2010; ALEXANDER et al., 2011; MURRAY; WYNN, 2011) e que, durante a inflamação no reparo do tecido conjuntivo (injúria de pele), um estudo demonstrou a maioria dos macrófagos F4/80+ recrutados eram também células CCR2+ (WILLENBORG et al., 2012). Também tem sido sugerido que células CCR2+ representam uma subpopulação de monócitos/macrófagos inflamatórios, que migram e se acumulam nos tecidos influenciando o curso de diversos processos inflamatórios e imunológicos (KURIHARA et al., 1997; JIA et al., 2008; SERBINA et al., 2008; AIELLO et al., 2010; GARLET et al., 2010; MILLER et al., 2012; RÉAUX-LE GOAZIGO et al., 2013), bem como de reparo/regeneração (XING et al., 2010; LU et al., 2011; WILLENBORG et al., 2012).

Com relação ao reparo e regeneração tecidual em diferentes tecidos, estudos recentes tem descrito os mecanismos pelos quais células CCR2+ parecem contribuir positivamente para tais processos (XING et al., 2010; LU et al., 2011; WILLENBORG et al., 2012). Em um modelo de estudo sobre regeneração de músculo esquelético, camundongos geneticamente deficientes para CCR2 (CCR2KO) apresentaram um significativo atraso na regeneração das injúrias realizadas no músculo em comparação a camundongos C57Bl/6-WT (*wild type*), acompanhado de uma drástica redução do número de macrófagos F4/80+ nas lesões de animais CCR2KO (LU et al., 2011). Além disso, os autores demonstraram que macrófagos F4/80+ recrutados via CCR2 (células CCR2+) contribuíram de forma significativa para regeneração muscular em animais WT, por meio da fagocitose de resíduos necróticos, induzindo o acúmulo de mais macrófagos no local da lesão e principalmente, produzindo altos níveis de IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina-I). Já em um estudo acerca do reparo de lesões de pele em camundongos, observou-se que macrófagos F4/80+ recrutados via CCR2 atuam como uma importante fonte de VEGF-A no local da lesão, influenciando positivamente o processo de angiogênese na fase inicial do reparo tecidual (WILLENBORG et al., 2012). Especificamente no tecido ósseo, um estudo demonstrou que camundongos CCR2KO apresentaram um significativo atraso no reparo de fraturas de tíbia, com diminuição significativa do recrutamento de macrófagos F4/80+, levando à diminuição transitória na vascularização no sítio da lesão nos estágios iniciais do reparo, um atraso na formação do calo ósseo aos 14 dias, bem como um retardo na remodelação do calo ósseo aos 21 dias, comparado aos mesmos eventos observados em animais WT (XING et al., 2010). Ainda neste mesmo estudo, a deficiência de CCR2 não interferiu na diferenciação de osteoclastos, mas parece ter prejudicado a função dessas células diminuindo a capacidade de reabsorção óssea em animais CCR2KO (XING et al., 2010).

O papel de CCR2 no tecido ósseo tem sido estudado também em outros modelos experimentais, fornecendo evidências sobre sua função durante a remodelação óssea em tratamentos ortodônticos (TADDEI et al., 2012) e em patologias bucais (GARLET et al., 2010). Em um modelo de movimentação ortodôntica, camundongos CCR2KO apresentaram uma significativa diminuição no recrutamento de osteoclastos nos locais de reabsorção, menor reabsorção óssea e

consequentemente menor movimentação ortodôntica comparados a animais WT (TADDEI et al., 2012). Já em um modelo experimental de lesão periapical (reação inflamatória crônica com infecção bacteriana), concluiu-se que CCR2 não é requerido para diferenciação de osteoclastos, mas verificou-se uma importante redução da ativação de macrófagos na lesão de animais CCR2KO em relação aos animais WT, compensada pelo aumento do número de neutrófilos, resultando no aumento da lesão osteolítica no local (GARLET et al., 2010).

Nota-se com os diferentes trabalhos citados, que o receptor CCR2 exerce uma importante influência nos processos de reparo/regeneração tecidual, por meio do recrutamento de macrófagos CCR2+, cuja presença parece impactar estes processos de diferentes formas. Especialmente no tecido ósseo, além de estar envolvido no recrutamento dessa subpopulação de macrófagos (GARLET et al., 2010; XING et al., 2010) CCR2 parece ainda estar envolvido na biologia de osteoclastos (XING et al., 2010; TADDEI et al., 2012). Todavia os possíveis efeitos regulatórios do receptor CCR2 crófagos durante o processo de reparo ósseo não são completamente conhecidos. Deve-se considerar que o modelo aqui proposto (reparo ósseo alveolar pós-exodontia, um osso de origem intramembranosa) difere significativamente dos modelos previamente investigados, tendo em vista a diferente natureza dos tecidos envolvidos (tal como o osso de origem endocondral no caso do reparo de tíbia), assim como a presença de microrganismos e a atividade predominante de osteólise no modelo de lesão periapical.

De uma forma geral, sabe-se que macrófagos são recrutados por mecanismos quimiotáticos geralmente no final da fase inflamatória aguda (SILVA et al., 2005), podendo exercer um relevante papel em virtude da sua capacidade de atuação na resposta imune e inflamatória, bem como apresentando um papel de destaque no reparo de tecidos por meio fagocitose de resíduos teciduais e células apoptóticas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; STEFATER et al., 2011; SICA; MANTOVANI, 2012). Tal função aplicada ao reparo alveolar, pode contribuir para a remoção do coágulo e posteriormente para substituição tecido de granulação por tecido ósseo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; CARDOSO, 2009; POLETI, 2009). Junto a isso, além de seu papel clássico de fagócito, macrófagos também são responsáveis pela secreção de diversas citocinas pró- e anti-inflamatórias (dependendo da fase e contexto da resposta) que atuam na ativação e controle da

resposta imunológica e da reparação tecidual, tais como que TNF- α , IL-10 e TGF- β (BOGDAN, 2000, 2001; GRAVES; COCHRAN, 2003; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; MURRAY; WYNN, 2011; SICA; MANTOVANI, 2012). Estudos prévios demonstram que tais moléculas (TNF- α , IL-10 e TGF- β) podem interferir direta ou indiretamente sobre a diferenciação e atividade de células ósseas, de modo que, a presença ou ausência de macrófagos (ou variações quantitativas em sua presença) em sítios de reparo ósseo pode influenciar de forma significativa o processo de reparo e osteogênese nestes locais (BOGDAN, 2000, 2001; GRAVES; COCHRAN, 2003; AL-AQL et al., 2008; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; ALEXANDER et al., 2011).

Diante do exposto, tal investigação do papel de células CCR2+ durante processo de reparo alveolar pós-exodontia em camundongos pode fornecer subsídios para melhorar o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares que ocorrem no sistema osteoimune em situações homeostáticas de reparo ósseo. Além disso, acredita-se que os resultados obtidos com trabalhos desta natureza possam culminar futuramente em implicações clínicas relevantes, como por exemplo, acelerar e favorecer o reparo ósseo pós-exodontia e conseqüentemente, diminuir o tempo entre a exodontia e a instalação de um implante osseointegrável.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi investigar o papel das células CCR2+ no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos, por meio de análises comparativas entre camundongos WT (C57Bl/6) e CCR2KO, permitindo o estabelecimento de relações diretas de causa e efeito da ausência de função/expressão do receptor CCR2 nos eventos biológicos verificados ao longo de diferentes períodos experimentais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Para o presente estudo, foram utilizados ao todo 72 camundongos C57Bl/6, machos, com idade aproximada de 8 semanas, sendo 36 animais da linhagem tipo-selvagem C57Bl/6 WT(*wildtype*) e 36 animais geneticamente deficientes (*knockout*, KO) para o receptor CCR2; constituindo portanto dois grupos: WT e CCR2KO. Os camundongos WT e CCR2KO foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP). Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C), ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, recebendo água *ad libitum*, e ração sólida (Ração Ativada Produtor - Anderson & Clayton S.A.) sem restrição, com exceção das primeiras 24 horas pós-cirurgia, em que essa alimentação foi triturada. Somente camundongos machos foram utilizados nesta pesquisa, a fim de evitar possíveis influências das variações hormonais sobre o processo de reparo ósseo alveolar.

Os 36 animais de cada linhagem, compondo um grupo WT e um grupo CCR2KO, foram submetidos à exodontia do incisivo superior direito e eutanasiados ao final dos períodos experimentais pré-estabelecidos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias. Para cada período, foram utilizados 5 animais de cada grupo para obtenção de imagens por microtomografia computadorizada (MicroCT) e análises microscópicas (análises histológicas, análise de birrefringência e imuno-histoquímica), e mais 4 animais para a análise molecular (PCRArray), totalizando 9 animais por grupo e período, conforme disposto na Tabela 1. O número de animais de cada grupo e os períodos experimentais foram determinados conforme já estabelecido em trabalhos anteriores utilizando este modelo de reparo (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013). Este trabalho foi realizado sob aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa com Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (CEEPA – #005/2012).

Tabela 1 - Tabela de contingência com o número de animais de cada grupo por período experimental e por procedimento de análise a ser realizado

Períodos	Divisão dos Procedimentos				Total
	MicroCT e Microscopia		PCRArray		
	WT	CCR2KO	WT	CCR2KO	
0d	5	5	4	4	18
7d	5	5	4	4	18
14d	5	5	4	4	18
21d	5	5	4	4	18
	20	20	16	16	72

3.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Para a realização da exodontia do incisivo superior direito, os animais foram submetidos à anestesia geral administrada via intramuscular, por meio de uma combinação do sedativo cloridrato de quetamina (15mg/kg - Dopalen[®], Agribrans do Brasil LTDA) e do relaxante muscular xilazina (10mg/kg - Anasedan[®], Agribrans do Brasil LTDA). Com o animal anestesiado, realizou-se a antisepsia da área cirúrgica com iodo tópico (Dermoidine[®] - Gessy Lever Industrial Ltda.) e o incisivo foi extraído por meio de adaptação da técnica de exodontia em ratos utilizada por outros autores (OKAMOTO; DE RUSSO, 1973). Para tanto, foram utilizados instrumentos adaptados: a extremidade curva de uma sonda exploradora nº 5 devidamente afiada para desinserção dos tecidos moles e luxação, e uma pinça previamente desgastada para a apreensão e extração propriamente dita do dente (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013). Em virtude do tamanho reduzido da área cirúrgica, foi utilizado um microscópio estereoscópico (DF Vasconcelos) nos aumentos de 16x e 25x (Figura 1).

Figura 1 - Procedimento de exodontia do incisivo superior direito em camundongo. **(a)** camundongo da linhagem C57Bl/6-WT; **(b)** procedimento de descolamento da mucosa e luxação; **(c)** remoção do dente do alvéolo; **(d)** alvéolo pós-exodontia.

3.3 COLETA DAS AMOSTRAS

Ao final de cada período experimental (0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia), os animais foram sacrificados por meio de injeção de dose excessiva de anestésico via intramuscular. Posteriormente, as amostras constituídas pelas maxilas contendo os alvéolos foram coletadas com o emprego de uma lâmina n°20 acoplada ao cabo de bisturi (VIEIRA, 2013).

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

Para as amostras de tecido alveolar utilizadas na análise molecular, foram utilizadas apenas a região do alvéolo das maxilas coletadas. Estas amostras foram fragmentadas com um cinzel, transferidas para um tubo “eppendorf” contendo Trizol (Invitrogen Life Technologies, EUA) e armazenadas a -70°C para posterior extração de RNA e análise de expressão gênica (GARLET et al., 2006a).

3.4 ANÁLISE DESCRITIVA POR MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (MicroCT)

A MicroCT foi empregada como um método complementar, para permitir uma análise descritiva por reconstrução tridimensional (3D) do reparo ósseo alveolar durante os diferentes períodos experimentais (0 hora, 7, 14 e 21 dias) em ambos grupos (WT e CCR2KO), facilitando também o entendimento anatômico do modelo experimental, conforme exemplificado na Figura 2. Para tanto, as maxilas coletadas acondicionadas em fixador alcoólico, foram escaneadas em MicroCT da marca SkyScan, modelo 1174 (Kontich, Bélgica), da disciplina de Endodontia da FOB/USP, bem como reconstruídas e analisadas com softwares próprios do aparelho (NRecon, Dataviewer, e CT-Vox).

O escaneamento das maxilas foi realizado com um tempo de aquisição de 33 minutos, utilizando-se os seguintes parâmetros tomográficos: 50 kV, 800 uA, com filtro de 0,5 mm Al, com 180 graus de rotação e intervalo de exposição de 1 grau, sendo as imagens capturadas com uma resolução de 1304 x 1024 pixels, com um tamanho de voxel de 14,12µm. Uma vez escaneadas, os espécimes foram encaminhados para o laboratório de histologia, para dar sequência ao processamento histotécnico de rotina.

As imagens obtidas a partir das maxilas escaneadas ("slices" ou cortes tomográficos) foram reconstruídas no software NRecon v1.6.4.8 (Skyscan), com parâmetros de reconstrução padronizados para todas as amostras. Na sequência, para obtenção das imagens tridimensionais em diferentes planos de secção (transaxial e sagital), as imagens reconstruídas no software NRecon foram realinhadas no software DataViewer 1.4.4.0, e posteriormente reconstruídas em 3D no software CTvox 2.3, por meio de renderização de volume, técnica que permite uma análise interativa da morfologia óssea de todo o alvéolo dental (Figura 2).

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

3.5 PROCEDIMENTOS HISTOTÉCNICOS

Após a fixação em formol por 24 horas, acondicionamento em fixador alcóolico e escaneamento em MicroCT, as amostras foram lavadas e desmineralizadas em solução de EDTA pH 7,2 (solução contendo 4,13% de Titriplex III Merck® e 0,44% de hidróxido de sódio) à temperatura de 2 a 8°C, por um período aproximado de quarenta dias, respeitando as trocas semanais da solução desmineralizadora e monitoramento por meio da análise radiográfica.

Posteriormente, as amostras foram lavadas em água corrente, imersas em água destilada por 24 horas visando à total remoção de EDTA, e em seguida submetidas à técnica de rotina para inclusão em parafina Histosec® (parafina + resina). Para inclusão, procedeu-se a desidratação das amostras em soluções crescentes de etanol (um banho de etanol 70% por 24 horas, um banho de etanol 80% por 1 hora, um banho de etanol 90% por 1 hora, um banho de etanol 95% por 1 hora, dois banhos de etanol 100% por 1 hora, um banho de etanol 100% por 24 horas). Em seguida as amostras desidratadas passaram por 3 banhos de 1 hora em soluções de xilol, e por fim foram incluídas em parafina para confecção dos blocos.

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

3.6 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DESCRITIVA E HISTOMORFOMÉTRICA

Para as análises histológicas descritiva (qualitativa) e histomorfométrica (quantitativa), foram obtidas 6 lâminas de cada animal, com 8 cortes semi-seriados em cada lâmina, os quais foram corados em HE para serem observados e analisados em microscópio óptico.

3.6.1 Análise histológica descritiva

A análise histológica descritiva foi realizada com emprego de um microscópio óptico binocular (OLYMPUS, modelo CH-2), sendo considerados os três terços do alvéolo dental (coronal, médio e apical) dos diferentes períodos experimentais (0 hora, 7, 14 e 21 dias) para ambos grupos (WT e CCR2KO). Optou-se por uma descrição histológica qualitativa mais abrangente da evolução do processo de reparo alveolar em objetivas menores (4x e 10x), e uma análise descritiva mais detalhada em objetiva de aumento de 40x, acompanhando os eventos de reparação óssea conforme os seguintes eventos:

- presença e reabsorção gradativa do coágulo sanguíneo;
- presença de infiltrado inflamatório;
- formação de tecido de granulação e sua transição para tecido conjuntivo, e deste para tecido ósseo neoformado;
- processo de remodelação das trabéculas ósseas neoformadas (evidenciado pela presença de osteoclastos);
- trabéculas ósseas já remodeladas, evidenciadas por linhas de reversão;
- maturação do tecido ósseo neoformado, sugerida pela presença de tecido medular.

3.6.2 Análise histomorfométrica

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

- coágulo sanguíneo
- infiltrado inflamatório (consideradas células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares distinguíveis em HE)
- vasos sanguíneos

- fibras colágenas (consideradas fibras colágenas todas as fibras presentes no alvéolo devido ao seu predomínio em relação aos outros tipos de fibra)
- fibroblastos
- matriz óssea
- osteoblastos
- osteoclastos
- outras estruturas (espaço preenchido por líquido intersticial, medula óssea ou estruturas dentárias)

Dos parâmetros histológicos supracitados, aqueles correspondentes ao tecido conjuntivo (fibroblastos, fibras colágenas, vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório) e ao tecido ósseo (matriz óssea, osteoblastos e osteoclastos), também foram analisados em conjunto, sendo somadas as densidades de área das estruturas correspondentes à cada tecido, proporcionando um dado mais abrangente para análise da cinética do reparo.

A densidade de área foi obtida por meio de contagem de pontos coincidentes sobre os critérios histológicos supracitados, com o emprego de uma lente ocular de compensação ZEISS kpl 8x (Carl-Zeiss MicroImaging Inc.), contendo uma grade ou retículo de integração II ZEISS e uma objetiva de imersão com o aumento de 100x, em microscópio óptico binocular (JENAMED 2 (Carl-Zeiss)).

O retículo de integração utilizado constitui uma grade composta por um quadrado que limita a área a ser estudada, e que contém um conjunto de 10 linhas paralelas sucessivas, divididas igualmente por 10 pontos, formando um sistema de 100 pontos (Figura 3 a). Assim, a sobreposição do retículo sobre o campo histológico permitiu a contagem de estruturas que fossem coincidentes com os pontos do retículo, sendo considerados ao todo 13 campos microscópicos distintos, dispostos regular e sistematicamente sobre um único corte histológico. Para cada animal, foram considerados pelo menos 3 cortes histológicos abrangendo o terço médio do alvéolo, sendo portanto contados ao todo 39 campos, conforme demonstrado na Figura 3 b. Os campos foram escolhidos com intervalos regulares em cada corte, de

maneira a se obter uma amostra representativa de toda área do corte (WEIBEL, 1969).

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

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

3.7 ANÁLISE DE BIRREFRINGÊNCIA

3.7.1 Método de polarização com Picrosirius Red

Para este experimento, os cortes histológicos de todos os períodos (0 hora, 7, 14 e 21 dias) abrangendo o terço médio do alvéolo dental de ambos grupos (WT e CCR2KO), foram corados com solução de Picrosirius Red e contra corados com Hematoxilina de Harris. Os cortes foram todos corados na mesma etapa para evitar

quaisquer variações de cor entre as amostras por possíveis diferenças na impregnação do corante.

A intensidade da birrefringência das fibras colágenas promovida pelo Picrosirius Red, foi emitida através de uma lente polarizadora acoplada a um microscópio invertido binocular Leica® (DM IRB/E) do Centro Integrado de Pesquisa da FOB/USP. Foram capturadas imagens abrangendo integralmente o corte histológico do alvéolo, em objetiva de 10x, a qual permitiu uma visualização adequada das fibras colágenas do alvéolo em reparação, desde as mais finas (emitindo birrefringência na tonalidade verde) até as mais espessas (emitindo birrefringência na tonalidade amarela e vermelha). Uma vez definida uma quantidade ótima de luz no microscópio óptico para visualização das fibras, e o ângulo da lente polarizadora (90° em relação à fonte de luz do microscópio), todas as imagens foram capturadas com o mesmo parâmetro e salvas em arquivo do formato TIFF, em alta resolução (1396 x 1626 pixels).

3.7.2 Quantificação das fibras birrefringentes

Foram avaliados pelo menos 4 cortes histológicos para cada animal, sendo capturada uma imagem para cada corte contendo todo campo de interesse. Entretanto, todas as imagens apresentavam algumas regiões de cortical alveolar contendo osso maduro adjacente ao alvéolo, sendo necessário subtrair essas regiões em software de edição Adobe Photoshop (versão CS4), a fim de evitar a quantificação de fibras colágenas não representativas do processo de reparo alveolar.

A quantificação da intensidade do brilho de birrefringência foi realizada utilizando o Software KS 300/400 com AxioVision (versão 4.8, CarlZeiss). Inicialmente foram definidos os espectros para cor verde, amarela e vermelha, seguindo valores de RGB (*Red, Green e Blue*), os quais foram padronizados para todas as imagens. Para a quantificação, as imagens foram binarizadas para cada espectro de cor, e a quantidade em pixels² de cada cor correspondente à área total delimitada no alvéolo foi mensurada pelo software, conforme exemplificado para o espectro da tonalidade vermelha (Figura 4). Posteriormente, foram calculadas as

médias dos valores em pixels² dos 4 cortes de cada animal. Esses valores foram submetidos a análise estatística calculando-se as médias e os desvios-padrão de cada grupo em cada período experimental.

Figura 4 - Exemplo do método de quantificação de fibras birrefringentes no alvéolo dental de camundongo WT aos 14 dias. Em **(a)** imagem polarizada capturada a partir de um corte histológico exibindo fibras colágenas birrefringentes nos 3 espectros de cor, sendo exemplificado o modo de binarização **(b)** para cor vermelha. *O mesmo procedimento foi realizado para o outros espectros em todos os períodos para ambos grupos.

3.8 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

3.8.1 Seleção dos anticorpos primários

A análise imuno-histoquímica do tecido alveolar pós-exodontia foi utilizada para localizar e quantificar leucócitos positivos para os receptores CCR2, CCR5 e F4/80. Para tanto, foram utilizados os seguintes anticorpos:

- anti-CCR2 (goat polyclonal), código sc-31564 (Santa Cruz, USA): recomendado para detecção de células CCR2+, incluindo linfócitos e monócitos/macrófagos
- anti-F4/80 (goat polyclonal), código 26642 (Santa Cruz, USA): F4/80 é uma molécula expressa na superfície de macrófagos, recomendada como um marcador específico para camundongos.
- anti-CCR5 (goat polyclonal), código sc-6129 (Santa Cruz, USA): recomendado para detecção de células CCR5+, incluindo linfócitos e monócitos/macrófagos.

A imunomarcção para células F4/80+ e células CCR5+, foi realizada em ambos grupos, WT e CCR2KO, seguindo os períodos de 7, 14 e 21 dias. Já as células CCR2+, foram analisadas apenas no grupo WT, seguindo os mesmos períodos acima.

3.8.2 Protocolo de imunomarcção

Para a imunomarcção com cada tipo de anticorpo (F4/80, CCR5 e CCR2), os cortes histológicos dispostos em lâminas sinalizadas foram desparafinados em estufa a 60°C por 40 minutos, e posteriormente passaram por dois banhos de xilol por 10 minutos e um banho de 5 minutos, dois banhos de etanol absoluto por 5 minutos e um banho em etanol hidratado 70% de 5 minutos. Subsequentemente, as lâminas foram lavadas em água por 3 minutos.

A fixação por formaldeído leva a uma ligação cruzada de pontes de metileno entre as proteínas do tecido, mascarando os antígenos (alvos para os anticorpos primários). Dessa forma, para recuperação dos antígenos, as lâminas contendo os cortes foram acondicionadas em solução tampão de citrato, em um Steamer, com temperatura de 96°C a 98°C, por 30 minutos, levando mais 10 minutos para retornarem à temperatura ambiente. Em seguida, a peroxidase endógena foi bloqueada por meio de um banho de 15 minutos em bloqueador de peróxido de hidrogênio 3% DHP - Hydrogen Peroxidase Block (Spring Bioscience Corporation, CA, USA). Então os cortes foram lavados em TBS e submetidos ao bloqueio das proteínas do soro com solução de leite em pó Molico® 7% (Nestlé Brasil Ltda, Araçatuba, São Paulo, Brasil) por 15 minutos. Removido o excesso de solução bloqueadora, os cortes foram cobertos com anticorpo primário específico diluído na proporção 1:50 µl com diluidor de anticorpo ADS-125 (Spring Bioscience Corporation, CA, USA), e incubados pelo período de uma hora em câmara úmida, escura e em temperatura ambiente.

Após incubação, os cortes foram lavados com TBS duas vezes por 5 minutos e incubados com o polímero universal N-Histofine - Simple stain Mouse anti-goat MAX PO (Nichirei Biosciences Inc.#414351F) durante 30 minutos à temperatura ambiente, sendo posteriormente lavados em TBS. Subsequentemente, para

revelação dos sítios antigênicos, os cortes foram expostos à solução de cromógeno DAB (solução líquida de 3,3'-diaminobenzidina, Dakocytomation Carpinteria, CA, USA) por um período de 2-3 minutos e contra-corados por 1 minuto com Hematoxilina de Mayer.

Para controle positivo e negativo dos 3 tipos de anticorpo, foi selecionado um corte histológico do baço de um camundongo C57Bl/6-WT, e para controle negativo, seguiu-se o mesmo protocolo de imunomarcção em um corte do baço e um corte do tecido alveolar, omitindo a incubação com anticorpo primário; neste caso as lâminas do controle negativo foram incubadas apenas com o diluidor.

3.8.3 Quantificação de células imunomarcadas

Uma vez realizada a imunomarcção, os cortes da região média de cada lâmina específica para cada anticorpo (F4/80+, CCR2+, CCR5+), foram submetidos à análise quantitativa, levando-se em consideração o mesmo retículo de integração utilizado na histomorfometria dos cortes em H.E; ou seja, um retículo II ZEISS contendo 100 pontos (representando 100% do campo) foi sobreposto ao campo histológico da lâmina de imuno-histoquímica e observado em uma objetiva de 100x, em microscópio óptico binocular (JENAMED 2 (Carl-Zeiss)). Realizou-se a contagem de pontos incidentes sobre células imunomarcadas dentro de um campo.

Foram quantificados cerca de 13 campos, o suficiente para abranger uma extensão significativa do corte do alvéolo, conforme também realizado na histomorfometria em HE. Entretanto, para proporcionar maior riqueza de dados, foram considerados para análise estatística tanto os valores absolutos (soma dos pontos incidentes em células imunomarcadas dentro da área do alvéolo), quanto os valores de densidade de área (percentual de células imunomarcadas dentro de cada alvéolo). Foram calculadas as médias e o desvios-padrão dos percentuais e valores absolutos obtidos nos animais pertencentes ao mesmo grupo dentro de cada período.

3.9 EXTRAÇÕES DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA

Para as análises moleculares, foram desprezadas as demais áreas da maxila, sendo utilizada somente a região do alvéolo dentário. As amostras foram fragmentadas com emprego de um cinzel autoclavado e tratado com água DEPC, e posteriormente foram transferidas para um tubo tipo “eppendorf” contendo reagente Trizol, necessário para extração do RNA total dos fragmentos. Para tanto foi utilizado o protocolo recomendado pelo fabricante (Invitrogen Life Technologies, EUA), na proporção de 1ml de Trizol para cada 1mg de tecido, agitado por 30 segundos e deixado à temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1ml da suspensão foi adicionado 0,2ml de clorofórmio (Sigma) e as amostras foram centrifugadas a 12000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (camada superior) foi transferida para um tubo novo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, agitado em seguida em “vortex” e incubado por 20 minutos a -20°C para precipitação do RNA da fase aquosa.

Novamente, os tubos passaram por centrifugação a 12000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em etanol 100%. Para permitir a secagem das amostras, os tubos foram invertidos sobre um papel de filtro e deixados em temperatura ambiente por 5 minutos dentro de uma capela de fluxo laminar vertical (para impedir a contaminação das amostras). Para redissolver o RNA total, as amostras foram suspensas em 50µl de água deionizada e livre de RNase, sendo então as amostras armazenadas a -70°C. Uma alíquota de 5µl foi utilizada para determinar a concentração de RNA/µl nas amostras, usando o aparelho GeneQuant (Pharmacia Amersham Biosciences, EUA). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa, com a utilização de uma transcriptase reversa (Kit de transcrição reversa - Superscript III, Invitrogen Life Technologies) utilizando 5µg de RNA total; e tendo como volume final de reação 200µl.

3.10 REAÇÕES DE PCRArray

Realizou-se nesta análise a quantificação da expressão de mRNA de diferentes marcadores moleculares conforme relacionados na Tabela 2, por meio de reações de PCRArray (SABiosciences - QIAGEN) a partir de um *pool* das amostras de 0 hora, 7, 14 e 21 dias da região dos alvéolos dentais provenientes de camundongos WT e CCR2KO. Para tanto, utilizamos um painel customizado contendo alvos dos painéis "Wound Healing" (PAMM-121), "Inflammatory cytokines and receptores" (PAMM-011) e "Osteogenesis" (PAMM-026). De forma geral, esse sistema realiza as reações de amplificação e detecção e quantifica as amostras através de nucleases fluorogênicas utilizadas na reação, sendo tal expressão normalizada com base em controles endógenos. O DNA complementar sintetizado a partir do RNA mensageiro, juntamente com os demais reagentes do kit (SABiosciences – QIAGEN) foram misturados para a formação de um *mix*, contendo: 1250 µl do tampão 2X *SuperArray RT²qPCR Master Mix*; 100 µl de reação de síntese de cDNA; 1250 µl de água deionizada 'DNase/RNasefree' (Invitrogen, LifeTechnologies). Na sequência foram adicionados 25 µl desta mistura em cada poço da placa (96 poços), já contendo os pares de *primers* liofilizados. Em seguida, a reação de PCR em tempo real foi executada no aparelho da ABI7500, compreendendo basicamente 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, e quarenta e cinco ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (ciclethreshold – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos aonde a amplificação das amostras, atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado, utilizando-se o *Software RT² Profiler PCR Array Data Analysis (SuperArray)*, que basicamente utiliza a fórmula $2^{(-DDCt)}$ para inicial normalização pela média geométrica de três genes constitutivos (Gapdh, Actb, Hprt1) e posteriormente normalizados pelo grupo controle, sendo expressos como *foldchange* em relação ao grupo controle. Genes apresentando valores de ciclo *threshold* (Ct) acima de 40 foram considerados não expressos.

Tabela 2 - Relação dos genes analisados por PCRArray

Fatores de crescimento	<i>Bmp2, Bmp4, Bmp5, Bmp6, Bmp7, Egf, Fgf1, Fgf2, Fgf3, Tgfb1, Vegfa, Vegfb</i>
Marcadores ósseos	<i>Runx2, Alpl, Ahsg, Ambn, Dmp1, Phex, Sost, Vdr, Rankl, Opg, Rank, Ctsk</i>
Marcadores de matriz/ Marcadores de reparo	<i>Col1a2, Col2a1, Col4a2, Col5a1, Mmp1a, Mmp2, Mmp8, Mmp9, Mmp10, Serpine1, Timp1, Timp3</i>
Citocinas	<i>IL1b, IL2, IL4, IL6, IL10, IL12, IL17, Ifng, Tnf</i>
Receptores de quimiocinas	<i>Ccr1, Ccr2, Ccr4, Ccr5, Ccr6, Ccr7, Ccr8, Ccr9, Cxcr1, Cxcr3</i>
Quimiocinas	<i>Ccl2, Ccl3, Ccl5, Ccl6, Ccl7, Ccl8, Ccl9, Ccl12, Ccl17, Ccl20, Ccl24, Ccl25, Cxcl3, Cxcl4, Cxcl5, Cxcl10, Cxcl11, Cxcl12, Cxcl13, Cx3cl1</i>
Marcadores de MSCs	<i>CD106, CD166, OCT-4, NANOG, CD44, CD34, CD73, CD146, NES, CD133, CD105, B2m, Gusb, Hsp90ab1</i>
Controles endógenos	<i>Gapdh, Actb, Hprt1</i>

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises entre três ou mais tempos, como os dados relativos à análises microscópicas quantitativas (histomorfométrica, de birrefringência e imuno-histoquímica) foram submetidos ao teste estatístico de Análise de Variância one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tuckey. Para análises entre apenas dois tempos ou amostras, foi utilizado o teste Mann-Whitney. No caso de análise de dados que não se enquadraram na distribuição de normalidade, foram utilizados testes como Kruskal-Wallis (seguido pelo teste de Dunns) e Mann-Whitney.

A significância estatística do experimento envolvendo a técnica de PCRArray foi avaliada pelo teste Mann-Whitney, sendo os valores submetidos ao teste de correção de Benjamini e Hochberg (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995).

Para todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes estatísticos, adequados aos experimentos, grupos e valores obtidos foram aplicados utilizando os programas GraphPad InStat e GraphPad Prisma 5 (GraphPad Software, San Diego, CA).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DESCRITIVA POR MicroCT DO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR PÓS-EXODONTIA EM CAMUNDONGOS WT E CCR2KO

Por meio da reconstrução tridimensional das maxilas escaneadas em MicroCT (CT-Vox), demonstrou-se comparativamente o processo de reparo ósseo alveolar em ambos grupos (WT e CCR2KO) ao longo dos tempos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Para melhor representar a evolução do reparo nas regiões mais centrais do alvéolo, elegeu-se o plano de secção transaxial, na altura do terço médio do alvéolo dental, e o plano de secção sagital na região medial em relação ao longo eixo do alvéolo. Dentro de uma escala de densidade tomográfica, as estruturas mais claras (hiperdensas) representam o tecido ósseo maduro que compunha as demais estruturas ao redor do alvéolo dental, servindo como parâmetro de comparação com a densidade tomográfica observada na área do alvéolo dental ao longos dos diferentes períodos (0 hora, 7, 14 e 21 dias).

No período 0 hora e 7 dias, observou-se uma cavidade hipodensa do lado direito das maxilas, nos planos de secção transaxial de ambos grupos (WT e CCR2KO), o qual é correspondente ao alvéolo dental pós exodontia, delimitado lateralmente pela paredes da cortical alveolar hiperdensa e por regiões hiperdensas relativas às estruturas de fundo. No plano de secção sagital, também foi observado espaço hipodenso no interior do alvéolo dental, sendo evidente a sobreposição de área hiperdensa relativa à cortical alveolar subjacente.

Conforme observado no plano transaxial no período de 7 dias, em ambos grupos, um estrutura hiperdensa e organizada destacou-se na região de fundo do alvéolo, a qual poderia ser confundida com tecido ósseo neofomado. Avaliando toda extensão do alvéolo dental em todos os períodos experimentais, como aos 14 e 21 dias demonstrados na Figura 5, notou-se também a presença desta estrutura hiperdensa mais organizada em alguns espécimes, que trata-se do germe dental remanescente.

Aos 14 e 21 dias, observou-se tecido ósseo neoformado preenchendo totalmente o interior dos alvéolos, evidente pela presença trabéculas ósseas

neoformadas e mineralizadas visualizadas nos dois planos de secção, transaxial e sagital, em camundongos WT e CCR2KO. Em suma, camundongos WT e CCR2KO apresentaram morfológicamente um processo de reparo muito semelhante ao longo dos períodos experimentais em relação à formação de tecido ósseo, o qual foi claramente distinguível nas imagens reconstruídas.

Figura 5 - Análise morfológica tridimensional por MicroCT (CTvox), do processo de reparo alveolar entre os grupos WT e CCR2KO nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Nota-se em 0 hora e 7 dias plano de secção transaxial com regiões hiperdensas no interior dos alvéolos, correspondentes à sobreposição de estruturas de fundo; plano sagital com espaço hipodenso no interior dos alvéolos, correspondentes à região ocupada por coágulo, com parede da cortical alveolar hiperdensa ao fundo, em ambos grupos. Aos 14 e 21 dias, nota-se em ambos grupos planos de secção transaxial e sagital com trabéculas ósseas mineralizadas hiperdensas no interior dos alvéolos. Barra de escala = 0,5 mm.

4.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA DO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR PÓS-EXODONTIA EM CAMUNDONGOS WT E CCR2KO

Realizou-se inicialmente uma descrição histológica qualitativa da cinética do reparo ósseo alveolar em cortes histológicos do alvéolo dental de camundongos WT, sendo estes dados utilizados como um controle para comparação do reparo ósseo alveolar em camundongos CCR2KO. Neste contexto, durante a cinética do processo de reparo alveolar em camundongos WT, foram observados os seguintes eventos histológicos: formação de coágulo sanguíneo no período de 0 hora; presença de tecido de infiltrado inflamatório, tecido de granulação e formação de tecido ósseo aos 7 dias; alvéolos dentais preenchidos por trabéculas ósseas neoformadas e tecido conjuntivo aos 14 dias; e presença predominante de trabéculas ósseas neoformadas, permeadas por medula óssea, aos 21 dias.

Conforme representado em uma visão panorâmica do terço médio do alvéolo dental (Figura 6), a cinética do processo de reparo alveolar em camundongos CCR2KO, seguiu um padrão semelhante ao descrito para camundongos WT, com formação de coágulo sanguíneo no período de 0 hora, passando pela formação de tecido conjuntivo e início da formação óssea aos 7 dias, e finalização do processo de reparo aos 21 dias.

De forma comparativa e considerando os eventos teciduais e celulares mais detalhadamente, no período de 0 hora ambos grupos (WT e CCR2KO) apresentaram alvéolo dental predominantemente preenchido por coágulo sanguíneo, contendo ainda alguns focos de infiltrado inflamatório conforme visualizado nos cortes histológicos representativos do terço médio do alvéolo dental (Figura 6).

Aos 7 dias os alvéolos dentais dos animais WT e CCR2KO encontravam-se preenchidos por um tecido de granulação ricamente vascularizado, caracterizado também pela presença de delicadas fibras colágenas e fibroblastos (Figuras 7 e 8). Focos residuais de coágulo sanguíneo foram notados em ambos grupos, WT e CCR2KO (Figura 8). Observou-se também a presença de um delicado infiltrado inflamatório (composto por células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares distinguíveis em HE) em ambos grupos. Principalmente nos alvéolos do grupo WT, notaram-se diversos sítios de reabsorção óssea sobre a superfície da parede alveolar, evidente pela presença de osteoclastos e lacunas de Howship

(Figura 8). Áreas indicando o início do processo de neoformação óssea estavam presentes tanto em animais WT como CCR2KO, sendo a matriz osteoide depositada a partir das paredes da cortical alveolar, possivelmente sobre superfícies recém reabsorvidas por osteoclastos (Figuras 7 e 8).

Aos 14 dias, observou-se tecido ósseo trabecular por toda extensão do alvéolo dental em ambos grupos (WT e CCR2KO), indicando adequada substituição do tecido conjuntivo por tecido ósseo primário (Figuras 6, 7 e 8). A persistência de um tecido conjuntivo rico em células e vasos sanguíneos em meio às trabéculas ósseas neoformadas ainda era evidente em ambos grupos neste período (Figuras 7 e 8). Observou-se também que as trabéculas primárias encontravam-se em franco processo de remodelação em virtude da presença de diversas superfícies trabeculares ocupadas por osteoclastos e lacunas de Howship em ambos grupos (WT e CCR2KO) (Figura 8).

Aos 21 dias, notou-se a finalização do processo de reparo em ambos grupos, com considerável regressão das áreas ocupadas por tecido conjuntivo, além da presença de tecido medular permeando o tecido ósseo neoformado (Figura 8). Poucas áreas de remodelação foram notadas em ambos grupos, como exemplificado para o grupo WT (Figura 8). Células com morfologia aparente de células de revestimento e outras com morfologia sugestiva de osteoblastos ativos foram notadas alinhadas ao redor das trabéculas ósseas em animais WT e CCR2KO; entretanto, notou-se um aparente predomínio de células de revestimento em camundongos WT, e de células com morfologia de osteoblastos ativos em animais CCR2KO (Figuras 7 e 8).

Figura 6 - Análise histológica panorâmica do processo de reparo alveolar em camundongos WT e CCR2KO, nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Fotomicrografias são representativas da região média do alvéolo dental, onde nota-se: coágulo sanguíneo (**CS**) e preservação da cortical alveolar (**setas fechadas**) imediatamente após a exodontia (**0 hora**); evolução para tecido de granulação (**TG**) e início de neoformação óssea (**seta aberta**) aos 7 dias; trabéculas ósseas neoformadas (*) aos 14 e 21 dias; em ambos grupos WT e CCR2KO. Coloração HE; objetiva de 10x; barra de escala = 200 μ m.

Figura 7 - Análise histológica comparativa do processo de reparo alveolar em camundongos WT e CCR2KO, nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Painel (a) - 7 dias: reparo alveolar com formação de tecido de granulação (TG) rico em vasos sanguíneos (VS) e matriz osteoide (-) em ambos grupos (WT e CCR2KO). Painel (b) - 14 dias: trabéculas ósseas neoformadas sendo remodeladas em ambos grupos, com predomínio de osteoclastos (setas) e vasos sanguíneos (VS) no grupo CCR2KO, e tecido conjuntivo mais celularizado (TC) no grupo WT. Painel (c) - 21 dias: fase final do processo de reparo, com predomínio de células de revestimento (CR) no grupo WT, e de células com morfologia sugestiva de osteoblastos ativos (OBL) no grupo CCR2KO. Fotomicrografias são representativas da região média do alvéolo dental. Coloração HE; objetivas de 20 e 40x; barra de escala = 100µm.

Figura 8 - Análise histológica comparativa de detalhes do processo de reparo alveolar em camundongos WT e CCR2KO, nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Aos 7 dias: áreas de reabsorção osteoclástica (**seta fechada**) na cortical alveolar (**CA**) principalmente no grupo WT, focos de coágulo sanguíneo (**CS**) em ambos grupos, conforme exemplificado para animais CCR2KO, deposição de matriz osteoide (*) e abundância de vasos sanguíneos (**VS**) em ambos grupos. Aos 14 dias: trabéculas ósseas neoformadas em remodelação em ambos grupos, com presença de osteoclastos (**setas fechadas**) e vasos sanguíneos (**VS**). Aos 21 dias: fase final do reparo alveolar com presença de tecido medular (**seta aberta**) e áreas de remodelação (**seta aberta**) em ambos grupos, como exemplificado para WT; predomínio de células de revestimento (**CR**) no grupo WT e de células com morfologia sugestiva de osteoblastos ativos (**OBL**) no grupo CCR2KO. Fotomicrografias são representativas da região média do alvéolo dental. Coloração HE; objetiva de 100x; barra de escala = 100µm.

4.3 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA COMPARATIVA DO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR PÓS-EXODONTIA EM CAMUNDONGOS WT E CCR2KO

Para a análise quantitativa, as estruturas descritas previamente foram categorizadas dentro de diferentes parâmetros histológicos, tais como: coágulo sanguíneo, fibroblastos, fibras colágenas, vasos sanguíneos, infiltrado inflamatório, matriz óssea, osteoblastos, osteoclastos e outras estruturas; sendo que, os parâmetros relativos ao tecido conjuntivo e tecido ósseo também foram analisados em conjunto, por meio da soma das densidades de área das estruturas correspondentes à cada um destes tecidos. Dessa forma, cortes histológicos do terço médio do alvéolo dental de camundongos WT e CCR2KO corados em HE, foram sistematicamente quantificados por meio de cálculo de densidade de área (%), permitindo assim uma análise comparativa dos eventos ocorridos entre os grupos WT e CCR2KO durante os períodos de 0 hora, 7, 14, e 21 dias. Adicionalmente, a comparação entre períodos dentro do mesmo grupo (cinética) também foi realizada.

Para organizar a disposição dos resultados de acordo com os tecidos observados na sequência do reparo, primeiro serão apresentados os resultados relativos ao coágulo sanguíneo e outras estruturas, em seguida os resultados referentes aos parâmetros de tecido conjuntivo (infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras) e por fim, de tecido ósseo (matriz óssea, osteoblastos e osteoclastos).

4.3.1 Densidade de área de coágulo sanguíneo e outras estruturas durante o reparo alveolar em camundongos WT e CCR2KO

Em relação à densidade de área de coágulo sanguíneo, não foram apontadas diferenças significantes entre os grupos WT e CCR2KO. Na análise da cinética, camundongos WT e CCR2KO apresentaram abundante densidade de coágulo no período de 0 hora, com diminuição significativa ($p < 0,05$) aos 7 dias (Figura 9 A).

Na análise da densidade de área do parâmetro "outras estruturas", foram apontadas diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os grupos WT e CCR2KO nos períodos de 14 dias e 21 dias. Nos períodos mais iniciais, o parâmetro "outras estruturas" foi inerente aos espaços vazios ocupados possivelmente por líquido intersticial, o qual diminuiu significativamente ($p < 0,05$) ao longo dos períodos de 7 e 14 dias em ambos grupos, WT e CCR2KO. Aos 21 dias, a densidade de área de "outras estruturas" aumentou ligeiramente em ambos grupos, sendo que neste período mais tardio, o parâmetro foi referente à presença medula óssea entre as trabéculas neoformadas (Figura 9 B).

Figura 9 - Análise comparativa da densidade de área (%) de coágulo sanguíneo e outras estruturas presentes no alvéolo dental de camundongos WT e CCR2KO nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. * ($p < 0,05$) indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos WT e CCR2KO, dentro do mesmo período experimental. Letras minúsculas diferentes representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os períodos dentro do mesmo grupo (WT ou CCR2KO).

4.3.2 Densidade de área de tecido conjuntivo durante o reparo alveolar em camundongos WT e CCR2KO

Em relação ao total das estruturas referentes ao tecido conjuntivo (soma do infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras colágenas), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os grupos WT e CCR2KO (Figura 10 A). Quanto à cinética, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) de tecido conjuntivo aos 7 dias em ambos grupos em relação ao período de 0 hora, o qual também foi diferente dos períodos de 14 e de 21 dias ($p < 0,05$) em

camundongos WT e CCR2KO. A área ocupada por tecido conjuntivo reduziu gradativamente a partir dos 7 dias em ambos grupos (WT e CCR2KO); com diferenças ($p < 0,05$) entre os períodos de 7 e 14 dias, e entre 7 e 21 dias no grupo WT, bem como diferenças ($p < 0,05$) entre 7 e 21 dias no grupo CCR2KO (Figura 10 A).

Considerando separadamente as estruturas relacionadas ao tecido conjuntivo, os grupos WT e CCR2KO foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) em pelo menos um tempo experimental para os diferentes parâmetros (Figura 10 B e E).

No grupo CCR2KO, a densidade de área de infiltrado inflamatório foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) aos 21 dias comparada densidade obtida no grupo WT. Em relação à cinética da área ocupada por infiltrado inflamatório, ambos grupos permaneceram sem diferenças significantes entre os períodos experimentais (Figura 10 B).

A densidade de área ocupada por vasos sanguíneos foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) no grupo CCR2KO aos 14 dias comparado ao grupo WT; já aos 21 dias, este padrão se inverteu, sendo tal densidade significativamente maior ($p < 0,05$) em animais WT. Na análise da cinética, a área ocupada por vasos sanguíneos aumentou gradativamente a partir dos 7 até os 21 dias em animais WT, com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre 0 hora comparado aos períodos 7, 14 e 21 dias; bem como entre os períodos de 7 e 21 dias, e entre 14 e 21 dias. No grupo CCR2KO, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) de vasos sanguíneos até o 14 dias, com diferenças entre 0 hora e todos os períodos subsequentes (7, 14 e 21 dias), bem como entre 7 e 14 dias. Ainda no grupo CCR2KO, aos 21 dias notou-se uma pequena redução da densidade de vasos sanguíneos (Figura 10 C).

Em relação à densidade de área de fibroblastos, foram apontadas diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os grupos WT e CCR2KO nos períodos de 7 e 14 dias, com maior densidade de área no grupo CCR2KO aos 7 dias, e no grupo WT aos 14 dias. Na análise da cinética, observou-se um padrão similar entre os grupos WT e CCR2KO, com maior densidade de fibroblastos aos 7 dias seguida por uma diminuição gradativa ao longo dos períodos de 14 e 21 dias. Foram apontadas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre o período de 0 hora e os demais tempos experimentais (7, 14 e 21 dias) em ambos grupos (WT e CCR2KO).

Foram observadas diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os tempos de 7 e 21 dias no grupo WT. Já no grupo CCR2KO, constataram-se diferenças ($p < 0,05$) entre os tempos de 7 e 14 dias, e entre 7 e 21 dias (Figura 10 D).

Considerando a densidade de área fibras colágenas, foram apontadas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os grupos WT e CCR2KO nos períodos de 14 e 21 dias, com densidade maior no grupo WT aos 14 dias, e maior no grupo CCR2KO aos 21 dias. Na comparação entre períodos, verificou-se maior ($p < 0,05$) densidade de fibras colágenas aos 7, 14, e 21 dias em relação ao período inicial (0 hora) em ambos grupos (WT e CCR2KO). Os grupos WT e CCR2KO apresentaram um pico na densidade de fibras colágenas aos 7 dias, com diminuição ao longo dos demais períodos experimentais (14 e 21 dias), sendo observadas diferenças significantes ($p < 0,05$) entre todos os períodos no grupo WT, e entre o período de 7 dias comparado ao de 14 e 21 dias no grupo CCR2KO (Figura 10 E).

Figura 10 - Análise comparativa da densidade de área (%) de tecido conjuntivo (**A**) e de seus componentes (**B-E**) presentes no alvéolo dental de camundongos WT e CCR2KO nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. *($p < 0,05$) indica diferenças estatisticamente significantes entre os grupos WT e CCR2KO, dentro do mesmo período experimental. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os períodos dentro do mesmo grupo.

4.3.3 Densidade de área de tecido ósseo durante o reparo alveolar em camundongos WT e CCR2KO

Em relação à densidade de área de tecido ósseo, os grupos WT e CCR2KO diferiram entre si ($p < 0,05$) no período de 21 dias, cuja densidade foi maior ($p < 0,05$) no grupo CCR2KO. Na cinética, a densidade de tecido ósseo passou a ser detectada na contagem a partir dos 7 dias em ambos grupos, WT e CCR2KO, com diferença entre 0h e os demais períodos. No grupo CCR2KO, ainda houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de 7 e 14 dias, e entre 7 e 21 dias (Figura 11 A).

Na análise individual dos componentes de tecido ósseo (osteoblastos, osteoclastos e matriz óssea), foram observadas diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os grupos WT e CCR2KO em relação aos parâmetros celulares, mas não em relação à matriz óssea. Na cinética de neoformação da matriz, foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os períodos de 7 e 14 dias, e entre 7 e 21 dias, tanto em camundongos WT como CCR2KO (Figura 11 B e D).

A densidade de área de osteoblastos foi maior ($p < 0,05$) aos 7 dias no grupo WT comparado ao grupo CCR2KO, situação que se inverteu aos 21 dias, sendo estatisticamente maior ($p < 0,05$) no grupo CCR2KO. Na análise da cinética, o período de 0 hora foi diferente ($p < 0,05$) dos demais períodos (7, 14 e 21 dias) no grupo WT, sendo observado um pico na densidade de área de osteoblastos aos 7 dias, o qual decresceu ao longo dos demais períodos (14 e 21 dias), com diferença significativa ($p < 0,05$) entre 7 e 21 dias. No grupo CCR2KO, também foram observadas diferenças significantes ($p < 0,05$) entre o tempo de 0 hora com os períodos subsequentes (7, 14 e 21 dias); entretanto, a partir dos 7 dias, o gráfico mostrou um aumento gradativo da densidade de osteoblastos até os 21 dias, mas sem diferenças entre os grupos (Figura 11 C).

Já a densidade de área de osteoclastos foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) no grupo CCR2KO aos 14 e 21 dias em relação ao grupo WT. Na análise da cinética, houve um pico na densidade de osteoclastos aos 14 dias em animais WT, diferindo significativamente apenas do período de 0 hora ($p > 0,05$). No grupo CCR2KO, o pico da densidade de osteoclastos também ocorreu aos 14 dias, sendo estatisticamente diferente ($p > 0,05$) de todos os outros tempos experimentais (0 hora, 7 e 21 dias).

Figura 11 - Análise comparativa da densidade de área (%) de tecido ósseo (A) e de seus componentes (B-D) presentes no alvéolo dental de camundongos WT e CCR2KO nos períodos de 0 hora, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. *($p < 0,05$) indica diferenças estatisticamente significantes entre os grupos WT e CCR2KO, dentro do mesmo período experimental. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os períodos dentro do mesmo grupo.

4.4 ANÁLISE DE BIRREFRINGÊNCIA DA MATRIZ COLAGENOSA DURANTE O REPARO ÓSSEO ALVEOLAR PÓS-EXODONTIA, EM CAMUNDONGOS WT E CCR2KO

A formação e maturação da matriz colagenosa foi analisada comparativamente em ambos grupos, WT e CCR2KO, por meio da birrefringência das fibras colágenas coradas com Picrosirius Red e observadas sob luz polarizada. As imagens dos alvéolos tanto de camundongos WT como CCR2KO, revelaram fibras colágenas birrefringentes nas tonalidades de cor verde, amarela e vermelha, representando qualitativamente diferentes estados de maturação das fibras ao longo dos períodos experimentais.

Na categorização dos espectros de cor, fibras birrefringentes dentro do espectro de cor verde foram relacionadas a uma matriz menos organizada e mais imatura, inversamente fibras com espectro de cor variando do amarelo para o vermelho foram relacionadas a uma matriz com maior grau de organização e maturação. Ainda, antes de polarizar as imagens para emissão da birrefringência, foram capturadas imagens das mesmas regiões polarizadas sob luz direta, permitindo a localização das estruturas sem propriedade de birrefringência (células, vasos sanguíneos, fibras não colágenas e outras estruturas), conforme representado na Figura 12.

No período de 0 hora, não foi detectada birrefringência evidente no interior do alvéolo, exceto uma pequena quantidade de fibras com espectro de cor verde inseridas na cortical alveolar, características de resquícios de fibras do ligamento periodontal pós-exodontia, em ambos grupos, WT e CCR2KO (dados não mostrados). Ao longo dos demais períodos, ambos grupos apresentaram um padrão similar tanto na quantidade total de fibras birrefringentes (pixels²), quanto na quantidade fibras com espectro de cor específico (Figura 13).

Aos 7 dias, alvéolos dentais de camundongos WT e CCR2KO continham tecido conjuntivo na região central e áreas de matriz osteoide sendo formadas a partir das corticais alveolares, observadas sob luz direta (Figura 12). Ao analisar as imagens sob polarização, as fibras colágenas provenientes principalmente das regiões de matriz osteoide emitiram birrefringência nos três espectros de cor mencionados, mas principalmente dentro do espectro de cor verde e vermelha

(Figura 12), representando a maior parte área (pixels²) quantificada, com diferenças estatisticamente ($p < 0,05$) significantes em relação às fibras de birrefringência amarela (Figura 13 B e E). Poucas fibras colágenas provenientes do tecido conjuntivo foram visualizadas sob polarização, muito delicadas e emitindo birrefringência na tonalidade verde (Figura 12).

Aos 14 e 21 dias, ambos grupos apresentaram um aumento na área de fibras birrefringentes em relação ao períodos de 7 dias (Figura 13 A), as quais apresentavam-se qualitativamente mais espessas e organizadas, devido ao espectro de cor variando do amarelo para o vermelho. Tais fibras arranjavam-se formando a matriz óssea das trabéculas neoformadas em animais WT e CCR2KO (Figura 12). Quantitativamente, cerca de 77% do total de área ocupada por fibras birrefringentes estavam dentro do espectro de cor vermelha, sendo esta área estatisticamente maior ($p < 0,05$) em relação à área ocupada por fibras colágenas dentro do espectro verde e amarelo, tanto em animais WT como CCR2KO (Figura 13 C e E). Assim, observou-se que a matriz colagenosa que compunha o tecido ósseo de ambos grupos ao final do reparo alveolar, apresentou um padrão similar na qualidade do colágeno, contendo uma considerável área de fibras mais espessas e maduras já no tempo 14 dias (Figura 12, Figura 13 C e D).

Figura 12 - Análise de birrefringência das fibras colágenas presentes no alvéolo dental nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-exodontia, nos grupos WT e CCR2KO. Fotomicrografias são representativas da região média do alvéolo dental, capturadas sob luz direta e luz polarizada, onde nota-se: deposição de poucas fibras colágenas com birrefringência visível nas tonalidades verde, amarela e vermelha aos 7 dias; deposição de fibras colágenas com birrefringência na tonalidade amarela e vermelha aos 14 e 21 dias; em ambos grupos, WT e CCR2KO. Coloração Picosirius-red; objetiva de 10x, barra de escala = 100 μ m.

Figura 13 - Análise quantitativa da área (pixels²) ocupada por fibras colágenas birrefringentes no alvéolo dental nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-exodontia, nos grupos WT e CCR2KO. Em **A**: total em pixels² da soma de fibras birrefringentes dentro do espectro verde (**G**), amarelo (**Y**) e vermelho ao longo dos períodos experimentais, com diferenças estatisticamente significativas dentro do mesmo grupo (WT ou CCR2KO) representadas por letras minúsculas distintas ($p < 0,05$). Em **B** (7 dias), **C** (14 dias) e **D** (21 dias): área em pixels² de fibras birrefringentes **G**, **Y** e **R**, e percentual relativo à área total (**T**); diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre fibras **G**, **Y** e **R** dentro do mesmo grupo, são indicadas por símbolos distintos (*, #). Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados.

4.5 CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS DURANTE O PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR PÓS-EXODONTIA EM CAMUNDONGOS WT E CCR2KO

Utilizou-se análise imuno-histoquímica para detectar e quantificar células CCR2+ no alvéolo dental de camundongos WT, bem como macrófagos F4/80+ e células CCR5+ em camundongos WT e CCR2KO, durante diferentes estágios do processo de reparo alveolar (7, 14 e 21 dias). Conforme exemplificado nas fotomicrografias no período de 7 dias (Figura 14), obteve-se um padrão satisfatório de imunomarcção citoplasmática para os 3 alvos. Dessa forma, foi possível a detecção de células CCR2+ (Figura 15), células F4/80+ (Figura 16) e células CCR5+ (Figura 17), localizadas em meio tecido conjuntivo e próximas a vasos sanguíneos aos 7, 14 e 21 dias.

Figura 14 - Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica para células CCR2+, F4/80+ e CCR5+ no período de 7 dias pós-exodontia, nos grupos WT e CCR2KO. Nota-se região média do alvéolo dental com células positivas para os três anticorpos, marcadas durante o processo inflamatório do reparo alveolar, aos 7 dias. Em (a;b) marcação para CCR2+ em animais WT; em (c;d) células F4/80+ em animais WT e CCR2KO, respectivamente; em (e;f) células CCR5+ em animais WT e CCR2KO, respectivamente. Coloração indireta MACH4 + DAB, contra-coloração Hematoxilina de Mayer; objetiva de 100x; barra de escala = 100µm.

Figura 15 - Análise imuno-histoquímica para células CCR2+ presentes no alvéolo dental nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-exodontia no grupo WT. Fotomicrografias são representativas da região média do alvéolo dental, com presença de células positivas para CCR2+ em meio ao tecido conjuntivo de animais WT, em todos os períodos citados. Coloração indireta MACH4 + DAB, contra-coloração Hematoxilina de Mayer; objetiva de 40x; barra de escala = 100µm.

Figura 16 - Análise imuno-histoquímica para células F4/80+ presentes no alvéolo dental nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-exodontia, em camundongos WT e CCR2KO. Fotomicrografias são representativas da região média do alvéolo dental, onde nota-se presença de células positivas para F4/80+ em meio ao tecido conjuntivo, em todos os períodos citados para ambos grupos (WT e CCR2KO). Coloração indireta MACH4 + DAB, contra-coloração Hematoxilina de Mayer; objetiva de 40x; barra de escala = 100µm.

Figura 17 - Análise imuno-histoquímica para células CCR5+ presentes no alvéolo dental nos períodos de 7, 14 e 21 dias pós-exodontia, no grupos WT e CCR2KO. Fotomicrografias são representativas da região média do alvéolo dental, onde nota-se presença de células positivas para CCR5+ em meio ao tecido conjuntivo, em todos os períodos citados para ambos grupos (WT e CCR2KO). Coloração indireta MACH4 + DAB, contra-coloração Hematoxilina de Mayer; objetiva de 40x; barra de escala = 100µm.

4.5.1 Cinética de recrutamento de células CCR2+ durante o reparo alveolar pós-exodontia em camundongos WT

Na análise quantitativa, realizada tanto para o número absoluto de pontos incidentes em células CCR2+ (Figura 18 A), como para o percentual (densidade de área) destas células no alvéolo (Figura 18 B), observou-se um pico de células CCR2+ aos 7 dias, ocupando a densidade média de $2,56 \pm 0,53\%$ da área total do alvéolo. Após os 7 dias, a densidade de área destas células diminuiu consideravelmente, sendo este período estatisticamente diferente ($p < 0,05$) dos períodos de 14 e 21 dias, cujo percentual médio de células CCR2+ caiu para $1,69 \pm 0,32\%$ e $1,43 \pm 0,16\%$, respectivamente.

Figura 18 - Análise quantitativa de células CCR2+ presentes no alvéolo dental do grupo WT aos 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Em **A**: número absoluto de pontos incidentes sobre células CCR2+ no alvéolo dental. Em **B**: número de pontos incidentes sobre células CCR2+ em relação ao total de pontos incidentes no alvéolo dental (densidade de área, %). Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os períodos dentro do mesmo grupo.

4.5.2 Cinética de recrutamento de células F4/80+ durante o processo de reparo alveolar pós-exodontia em camundongos WT e CCR2KO

Obteve-se um número absoluto maior de células F4/80+ em camundongos WT comparado ao grupo CCR2KO em todos os períodos, mas com diferenças

estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os grupos apenas nos períodos de 7 e 14 dias (Figura 19 A).

Aos 7 dias, o número total médio de células F4/80+ no alvéolo dental de camundongos WT foi de $37 \pm 8,0$ células contra $10 \pm 4,08$ células em camundongos CCR2KO; aos 14 dias, este valor caiu para $17,25 \pm 1,50$ células em animais WT, e permaneceu com cerca de $10,00 \pm 4,24$ células em animais CCR2KO; e aos 21 dias, foram quantificadas em média $20,25 \pm 4,57$ células em animais WT contra $16,75 \pm 10,24$ células em animais CCR2KO (Figura 19 A).

Na análise estatística do percentual médio da densidade de área ocupada células F4/80+ em relação área total do alvéolo, foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos WT e CCR2KO aos 7 e 21 dias. Aos 7 dias, o grupo WT apresentou um pico na densidade de $3,68 \pm 0,94\%$ contra $1,04 \pm 0,46\%$ da área ocupada no grupo CCR2KO; aos 21 dias, a densidade de área foi $2,30 \pm 0,74\%$ no grupo WT contra $5,75 \pm 0,34\%$ no grupo CCR2KO (Figura 19 B).

Comparando as duas análises, embora tenha sido detectado um número total de células F4/80+ sem diferença significativa entre os grupos WT e CCR2KO, na análise do percentual da área ocupada por estas células, o grupo CCR2KO foi significativamente maior que o grupo WT. Analisando individualmente os valores dos campos contados no grupo WT, observou-se que para alguns animais, havia uma maior concentração de células em determinados campos a despeito de outros, cujo valor era 0, o que não afetou a estatística de números absolutos, relativo a soma de todos os campos, mas sim a densidade de área, que levou em consideração a média de todos os campos. No grupo CCR2KO, o número absoluto de células era menor, mas a distribuição destas células nos campos estava mais homogênea. Assim, na análise da densidade de área, o cálculo da média de células F4/80+ dentro de um alvéolo, resultou num percentual de área ocupada menor em WT do que em CCR2KO, embora a soma do total de células F4/80+ em WT tenha sido maior.

Por fim, a cinética de migração de células F4/80+ em camundongos WT, mostrou um padrão decrescente ao longo dos períodos experimentais de 7, 14 e 21 dias (Figura 19 A e B), conforme também observado para células CCR2+ nestes animais. Por outro lado, a cinética de migração de células F4/80+ em camundongos CCR2KO, mostrou um padrão crescente, com diferença estatisticamente significativa

entre todos os períodos experimentais no cálculo da densidade de área (%) do alvéolo ocupada por tais células.

Figura 19 - Análise quantitativa de células F4/80+ presentes no alvéolo dental de camundongos WT e CCR2KO aos 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Em **A**: número absoluto de pontos incidentes sobre células CCR2+ no alvéolo dental. Em **B**: número de pontos incidentes sobre células F4/80+ em relação ao total de pontos incidentes no alvéolo dental (densidade de área, %). Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os períodos dentro do mesmo grupo.

4.5.3 Cinética de recrutamento de células CCR5+ durante o processo de reparo alveolar pós-exodontia em camundongos WT e CCR2KO

Para células CCR5+, tanto na análise quantitativa de números absolutos, como da densidade de área, foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos WT e CCR2KO aos 7 dias (Figura 20 A e B), cujo número de células foi em média de $20,40 \pm 8,82$ contra $8,75 \pm 3,09$, respectivamente; com percentual de densidade de área de $2,83 \pm 0,64\%$ em animais WT, contra o percentual médio $0,90 \pm 0,31\%$ em animais CCR2KO.

Observando a cinética células CCR5+ em animais WT, constatou-se um padrão decrescente ao longo dos períodos experimentais, semelhante tanto para o número absoluto quanto para densidade de área, com um pico aos 7 dias ($2,83 \pm 0,64\%$), seguido de uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no período de 21 dias ($0,73 \pm 0,51\%$). Já na cinética de células CCR5+ obtida para animais CCR2KO,

não houve alteração estatisticamente significativa entre os períodos experimentais (Figura 20 A e B).

Figura 20 - Análise quantitativa de células CCR5+ presentes no alvéolo dental de camundongos WT e CCR2KO aos 7, 14 e 21 dias pós-exodontia. Em **A**: número absoluto de pontos incidentes sobre células CCR2+ no alvéolo dental. Em **B**: número de pontos incidentes sobre células CCR5+ em relação ao total de pontos incidentes no alvéolo dental (densidade de área, %). Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os períodos dentro do mesmo grupo.

4.6 ANÁLISE MOLECULAR: PERFIL GERAL DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS MARCADORES ENVOLVIDOS NO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS WT E CCR2KO

Buscando comparar o perfil molecular do alvéolo em reparo de camundongos WT e CCR2KO, foram realizadas reações por PCRArray considerando-se um *pool* de amostras abrangendo os 4 períodos experimentais (0 hora, 7, 14 e 21 dias) para cada uma das linhagens. Dessa forma, os resultados apresentados a seguir demonstram um perfil geral de expressão de marcadores pré-determinados possivelmente envolvidos no processo de reparo alveolar em camundongos WT e CCR2KO, especificamente fatores de crescimento, marcadores ósseos, marcadores de matriz, citocinas, quimiocinas e receptores de quimiocinas, bem como marcadores de MSCs.

Analisando os fatores de crescimento envolvidos no processo de reparo, identificou-se uma alta expressão para fatores da superfamília do TGF- β , como as

proteínas ósseas morfogenéticas (BMP-2, BMP-4 e BMP-7) com um padrão similar de expressão em ambos grupos, enquanto a expressão do próprio TGF- β foi significativamente maior ($p < 0,05$) em camundongos WT comparado aos animais CCR2KO. Outros fatores de crescimento, como FGF-1 e FGF-2 os fatores angiogênicos VEGFa e VEGFb, também apresentaram níveis consideráveis de expressão em ambos grupos (Figura 21 A).

Considerando os diferentes marcadores de matriz, destacou-se a expressão de COL1 (COL1A2) e colágeno tipo 2 (COL2A1) em ambas linhagens WT e CCR2KO, com diferença significativa ($p < 0,05$) para expressão de COL1, sendo mais expresso em camundongos CCR2KO em relação aos animais WT. Já dentre os marcadores envolvidos na remodelação dos tecidos, como metaloproteases da matriz (MMPs) e suas inibidoras (TIMPs), verificou-se uma alta expressão para diferentes MMPs (MMP-1a, MMP-2, MMP-9) em ambos grupos, sendo seus níveis maiores ($p < 0,05$) em camundongos CCR2KO comparados aos camundongos WT (Figura 21 B).

Dentre os marcadores ósseos analisados, os marcadores de diferenciação e de atividade de osteoblasto, respectivamente RUNX-2 e fosfatase alcalina (ALP), tiveram altos níveis de expressão detectados em ambos grupos, sendo RUNX-2 significativamente maior ($p < 0,05$) em camundongos WT em relação aos animais CCR2KO. Já os níveis de expressão de marcadores de diferenciação de osteócitos (DMP1 e PHEX) e marcadores de diferenciação e atividade de osteoclastos (RANK e RANKL), foram maiores ($p < 0,05$) em camundongos CCR2KO comparados aos animais WT. Entretanto, a expressão detectada para o marcador de atividade osteoclástica cathepsina K (CTSK), foi maior ($p < 0,05$) em camundongos WT em relação aos animais CCR2KO (Figura 21 C).

Com relação a expressão de citocinas, observou-se uma alta expressão citocinas pró-inflamatórias em ambos grupos, com destaque para maior expressão ($p < 0,05$) de IL-6 nos camundongos CCR2KO comparado aos animais WT, enquanto os níveis de expressão para TNF- α foi maior ($p < 0,05$) nos camundongos WT comparado aos CCR2KO. Paralelamente, altos níveis de expressão foram detectados para citocina anti-inflamatória IL-10, com padrão similar em ambos grupos (Figura 22 A).

Considerando a participação de diferentes tipos de células inflamatórias durante o reparo, diversos alvos para quimiocinas e seus receptores foram expressos em ambos grupos. Conforme esperado, CCR2 foi altamente expresso ($p < 0,05$) durante o reparo em camundongos WT em relação ao controle endógeno. Camundongos WT apresentaram maior expressão ($p < 0,05$) para CCR1 e CCR5 em relação a animais CCR2KO, enquanto os níveis de expressão de CXCR1 (quimiotaxia e ativação de neutrófilos) foram maiores ($p < 0,05$) em camundongos CCR2KO comparado aos WT (Figura 22 B). Dentre as quimiocinas analisadas, um padrão similar dos níveis de expressão de CCL2 foi observado em ambos grupos, ligeiramente maior em CCR2KO, mas sem diferenças estatisticamente significante. Verificou-se ainda maior expressão ($p < 0,05$) para diferentes ligantes envolvidos em geral na quimiotaxia de monócitos e linfócitos (CCL2, CCL20, CCL25, CXCL12) em camundongos WT comparados aos animais CCR2KO (Figura 22 C).

Por fim, considerando a presença de MSCs como indispensável para o reparo tecidual, analisou-se a expressão de diversos marcadores supostamente expressos por tais células. Neste sentido, verificou-se uma evidente expressão CD106, CD166, OCT-4, NANOG, CD44, CD34, CD73, CD146, NES, CD133, CD105 e Hsp90ab1 (*Heat shock protein HSP 90-beta*) em ambos grupos, com destaque uma expressão significativamente maior ($p < 0,05$) de CD106, OCT-4, NANOG, CD146 e CD105 nos camundongos WT comparado aos animais CCR2KO (Figura 23).

Figura 21 - Análise molecular do perfil geral da expressão gênica de marcadores de reparo no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos WT e CCR2KO. Análise por PCRArray (SABiosciences – QIAGEN), utilizando um painel customizado contendo alvos dos painéis “WoundHealing” (PAMM-121) e “Osteogenesis” (PAMM-026), para fatores de crescimento **(A)**, marcadores de matriz **(B)** e marcadores ósseos **(C)**. Resultados descritos pelo aumento de vezes da expressão do mRNA a partir de medições triplicado em relação ao controle de amostras e normalizada inicialmente pelos controles endógenos *Gapdh*, *Hprt* e *Actb* utilizando o método de limiar de ciclo (Ct) e em seguida normalizados pelas amostras controle. Resultados representam expressão relativa aos controles. *indica valores estaticamente diferentes entre os grupos WT e CCR2KO $p < 0,05$, pelos testes Mann-Whitney com correção de Benjamini e Hochberg.

Figura 22 - Análise molecular do perfil geral da expressão gênica de marcadores imunológicos no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos WT e CCR2KO. Análise por PCRArray (SABiosciences – QIAGEN), utilizando um painel customizado contendo alvos do painel “Inflammatory cytokines and receptors” (PAMM-011) para citocinas **(A)**, receptores de quimiocina **(B)** e quimiocinas **(C)**. Resultados descritos pelo aumento de vezes da expressão do mRNA a partir de medições triplicado em relação ao controle de amostras e normalizada inicialmente pelos controles endógenos *Gapdh*, *Hprt* e *Actb* utilizando o método de limiar de ciclo (Ct) e em seguida normalizados pelas amostras controle. Resultados representam expressão relativa aos controles. Para melhor visualização dos resultados estatísticos entre os grupos WT e CCR2KO, não foram apontadas diferenças estatísticas entre os grupos e os valores controle, exceto para *Ccr2* (expresso em WT), conforme indicado #. Em (A), (B) e (C), * indica valores estatisticamente diferentes entre os grupos WT e CCR2KO $p < 0,05$, pelos testes Mann-Whitney com correção de Benjamini e Hochberg.

Figura 23 - Análise molecular do perfil geral da expressão gênica de marcadores para MSCs no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos WT e CCR2KO. Análise por PCRArray (SABiosciences – QIAGEN), utilizando um painel customizado contendo alvos dos painéis “WoundHealing” (PAMM-121), para supostos marcadores de MSCs. Resultados descritos pelo aumento de vezes da expressão do mRNA a partir de medições triplicado em relação ao controle de amostras e normalizada inicialmente pelos controles endógenos *Gapdh*, *Hprt* e *Actb* utilizando o método de limiar de ciclo (Ct) e em seguida normalizados pelas amostras controle. Resultados representam expressão relativa aos controles. * indica valores estaticamente diferentes entre os grupos WT e CCR2KO $p < 0,05$, pelos testes Mann-Whitney com correção de Benjamini e Hochberg.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Considerando que o presente trabalho teve como objetivo a investigação do papel de células CCR2+ no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos, animais da linhagem WT e CCR2KO foram submetidos à exodontia do incisivo superior direito para posteriores análises histológicas e moleculares dos eventos relacionados ao reparo, ao longo de diferentes períodos experimentais (0 hora, 7, 14 e 21 dias). Adicionalmente, embora as análises histológicas forneçam informações exclusivas sobre a celularidade e a dinâmica tecidual do reparo ósseo, utilizamos também imagens tridimensionais obtidas a partir de MicroCT, para uma análise descritiva do reparo alveolar em ambas linhagens. Quanto aos tempos experimentais, estes também foram definidos conforme padronização prévia em camundongos C57Bl/6-WT (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013) considerando o tempo de 21 dias como um estágio de finalização do processo de reparo (21 dias), em virtude da presença de tecido ósseo lamelar permeado por medula já nesta etapa, e pela maior quantidade de osso observada em relação aos tempos posteriores (28, 35 e 42 dias).

Nas reconstruções tridimensionais obtidas por MicroCT, verificamos um espaço hipodenso do alvéolo dental no período de 0 hora (Figura 5), correspondente ao espaço preenchido por coágulo sanguíneo nos cortes histológicos (Figura 6), enquanto aos 7 dias, a hipodensidade observada (Figura 5) foi correspondente à região ocupada por tecido de granulação e osteoide (Figura 7 a), tanto em animais WT como CCR2KO. A presença das trabéculas ósseas mineralizadas preenchendo toda extensão do alvéolo foi evidente pela hiperdensidade de estruturas notáveis a partir dos 14 dias, em camundongos WT e CCR2KO (Figura 5). Embora não tenhamos notado diferenças entre os grupos nesta análise descritiva, consideramos futura padronização de uma análise morfométrica por esta metodologia, que possa servir para comparação da qualidade do tecido ósseo entre os grupos, por meio de parâmetros como densidade óssea, arquitetura trabecular e volume tecidual (BOUXSEIN et al., 2010).

Conforme os resultados da análise histológica descritiva (Figuras 6-8), notamos uma sequência de reparo similar entre camundongos WT e CCR2KO, com

adequada formação de coágulo sanguíneo no período de 0 hora até o completo preenchimento dos alvéolos dentais com tecido ósseo maduro permeado por tecido medular aos 21 dias, passando pelo estágio inflamatório (7 dias) e de intensa atividade de remodelação óssea (14 dias) (Figuras 6-8). Tais resultados são compatíveis com a cronologia de reparo ósseo alveolar em camundongos WT, já descrita em nossos trabalhos anteriores (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013). Dessa forma, como uma caracterização histológica detalhada deste processo foi previamente realizada em camundongos WT (VIEIRA, 2013), a discussão dos nossos próximos resultados será limitada às análises comparativas da dinâmica tecidual e celular do processo de reparo ósseo entre animais WT e CCR2KO, correlacionando-se ao mesmo tempo tais resultados com a quantificação da expressão de diferentes alvos moleculares obtidos a partir de reações de PCRArray.

No primeiro estágio do processo de reparo, imediatamente após a exodontia, ocorre a formação e subsequente maturação do coágulo sanguíneo. Tal processo inicia uma série de eventos celulares e moleculares que resultam gradualmente no estabelecimento do tecido de granulação e do processo inflamatório, de modo que o coágulo organizado serve como um arcabouço provisório para invasão de células constitutivas, leucócitos e novos capilares sanguíneos, além de contribuir inicialmente para a liberação diversos fatores de crescimento e citocinas, oriundos de plaquetas ativadas (NURDEN, 2011; BURNOUF et al., 2013). Tem sido demonstrado que fatores de crescimento, liberados também por diferentes tipos celulares, desempenham um papel chave na resposta celular durante o reparo ósseo, a exemplo da participação de TGF- β 1, BMPs (BMP-2 e 4), FGF-2 no recrutamento, proliferação e diferenciação de células tronco multipotentes (SCHINDELER et al., 2008; BAIS et al., 2009; NURDEN, 2011), da influência de FGF-2, BMPs (BMP-2 e -6) e VEGFa nos processos de angiogênese (FERRARA, 2000; BURNOUF et al., 2013), da participação de TGF- β 1 e BMPs na diferenciação e mitose de osteoblastos, e do papel TGF- β 1 no estímulo da síntese de colágeno e fibronectina (NURDEN, 2011; REINKE; SORG, 2012; BURNOUF et al., 2013).

Nesse sentido, uma evidente expressão de fatores da superfamília do TGF- β (TGF- β 1 e diferentes BMPs), bem como FGF (FGF-1 e FGF-2) e VEGF (VEGFa) foi observada em nossa análise molecular na região de reparo alveolar ao longo dos períodos experimentais, tanto em camundongos WT como CCR2KO (Figura 21 A).

Estudos prévios em camundongos WT (VIEIRA, 2013), demonstram que o pico de expressão de TGF- β 1, BMP-2, BMP-4, BMP-7 e VEGFa ocorre aos 7 dias nestes animais. Assim, considerando o tempo de 7 dias e sabendo das funções atribuídas a essas moléculas, tais achados correlacionam-se com os eventos teciduais observados em no reparo de ambos grupos (WT e CCR2KO), sendo que neste período verificamos um pico de densidade de área ocupada tecido conjuntivo (Figura 10), com características de tecido de granulação rico em vasos sanguíneos, circundado por áreas de início de neoformação óssea, com evidente diferenciação osteoblástica e deposição ativa de matriz osteoide (Figuras 6 e 7). De fato, ao mesmo tempo em que análise histomorfométrica apontou um pico de tecido conjuntivo aos 7 dias, notou-se também um início bem marcado da neoformação óssea tanto em camundongos WT como CCR2KO (Figura 11 A).

Embora todos esses fatores de crescimento tenham sido altamente expressos em camundongos WT e CCR2KO, correlacionando-se adequadamente com os primeiros eventos histológicos descritos, identificamos uma diferença significativa ($p < 0,05$) para menores níveis de expressão de TGF- β 1 em camundongos CCR2KO. Tal resultado nos leva a um primeiro indício do papel de células CCR2+ no reparo ósseo alveolar em camundongos, de modo que a presença de células CCR2+ pode contribuir de forma adicional para maior expressão de TGF- β 1, seja como uma fonte dessa molécula ou por regular a produção TGF- β 1 em outras células.

Sabe-se que TGF- β 1 tem um papel crucial na formação óssea durante o reparo, melhorando a quimiotaxia e funções mitóticas de MSCs por estímulos autócrinos e parácrinos (NURDEN, 2011; CHEN; DENG; LI, 2012). Além disso, TGF- β 1 também regula o comprometimento inicial de tais células com a linhagem osteoblástica e induz a diferenciação osteoblástica inicial por estimular RUNX-2 (LEE et al., 2003; TACHI et al., 2011; CHEN; DENG; LI, 2012). Assim, a maior expressão de TGF- β 1 em camundongos WT poderia levar consequentemente, à maior expressão de marcadores de MSCs nestes animais, bem como maior expressão de RUNX-2 em comparação ao observado em animais CCR2KO.

De fato, a análise do perfil geral de marcadores para MSCs apontou para uma expressão significativamente maior ($p < 0,05$) dos alvos CD105, CD 106, CD146, OCT-4, NANOG e CXCL12 em camundongos WT (Figuras 22 C e 23). Considerando

a natureza e função destes marcadores, nota-se uma positiva correlação da sua alta expressão com a expressão de TGF- β 1 durante o reparo, uma vez que: CD105 (endoglin) constitui a proteína de ligação (receptor) do TGF- β à superfície celular, associada à proliferação desencadeada por tal ligante (DUFF et al., 2003); CD106 (VCAM-1) e CD146 são moléculas de adesão, cuja função compreende uma cooperação na transmigração de células indiferenciadas para os tecidos (PITTENGER et al., 1999; CHAMBERLAIN et al., 2007); enquanto NANOG e OCT-4 são importantes fatores de transcrição e reguladores-chave da pluripotência em MSCs, não sendo expressos em células diferenciadas (TRUBIANI et al., 2008; PIERANTOZZI et al., 2011). Quanto à quimiocina CXCL12, tem sido demonstrado que, por meio da sua ligação com CXCR4, tal ligante promove a mobilização de MSCs a partir da medula óssea, mas também pode recrutar Tregs por este mesmo eixo (TAKAYANAGI, 2007; TRUBIANI et al., 2008). Sabendo que tanto MSCs e Tregs são uma importante fonte TGF- β 1 e IL-10, o recrutamento de Tregs também contribui para a resolução do processo inflamatório e do reparo tecidual (JONES; YANG, 2011; WANG; ZHAO; SHI, 2012). Assim, um maior o recrutamento de ambas (MSCs e Tregs) pode ter cooperado para aumentar também a expressão de TGF- β 1 em camundongos WT.

Paralelamente aos achados moleculares, os resultados da análise histomorfométrica apontaram para uma quantidade significativamente maior de osteoblastos em camundongos WT comparados aos animais CCR2KO aos 7 dias (Figura 11 C). De forma interessante, a cinética de densidade de osteoblastos seguiu um padrão decrescente em camundongos WT, com uma quantidade significativamente menor de osteoblastos aos 21 dias ($p < 0,05$), enquanto um padrão crescente, mas sem alterações significantes entre os períodos, foi observado em camundongos CCR2KO (Figura 11 C). Analisando a densidade de osteoblastos em ambos grupos, observamos diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre camundongos WT e CCR2KO aos 7 e 21 dias (Figura 11 C). Levando em consideração que não é possível distinguir osteoblastos completamente maduros de células osteoprogenitoras ou pré-osteoblastos na análise histológica em HE, como os dados moleculares sugerem, possivelmente uma parte dos osteoblastos quantificados em ambos camundongos WT e CCR2KO, poderiam ser células precursoras osteogênicas ou pré-osteoblastos, estando em maior quantidade em

camundongos WT aos 7 dias, possivelmente pela maior expressão de TGF- β 1 neste animais no mesmo período (VIEIRA, 2013). Ou seja, a presença de células CCR2+ em animais WT pode influenciar o recrutamento de células osteogênicas via expressão de TGF- β 1.

Entretanto, a menor quantidade de osteoblastos em animais CCR2KO observada aos 7 dias (Figura 11 C), não afetou a densidade de matriz óssea depositada ao longo do reparo nestes animais, de modo que densidades similares de matriz foram observadas em ambos grupos (WT e CCR2KO) dos 7 aos 21 dias (Figura 11 B). Logo, acredita-se que a suposta maioria de células osteogênicas presentes camundongos WT, não tenha refletido em uma maior densidade de osteoblastos maduros nestes animais em comparação aos animais CCR2KO.

Neste contexto, sabe-se TGF- β 1 e BMP-2 desempenham um papel central na diferenciação osteoblástica por regularem o fator de transcrição RUNX-2, possivelmente por vias distintas (LEE et al., 2003; CHEN; DENG; LI, 2012). De fato, tal como para a expressão TGF- β 1, a expressão de RUNX-2 também foi menor nos alvéolos de camundongos CCR2KO comparados aos WT, enquanto BMP-2 apresentou níveis similares de expressão em ambos grupos (Figura 21 A). Vale ressaltar que, apesar de BMP-2 e TGF- β 1 estimularem a expressão de Runx2, apenas BMP-2 parece ser capaz de induzir a expressão de marcadores osteogênicos (tal como ALP) e a diferenciação final de osteoblastos (LEE et al., 2003; TSUJI et al., 2006; BAIS et al., 2009). Dessa forma, a menor expressão de TGF- β 1 e RUNX-2 em camundongos CCR2KO pode ser um reflexo da menor quantidade de células expressando tais marcadores nestes animais, mas não de uma menor diferenciação osteoblástica. De fato, a expressão de ALP (mRNA *Alpl*), um marcador dos estágios iniciais da diferenciação de osteoblastos, apresentou um padrão similar entre camundongos WT e CCR2KO. Ainda, a expressão do marcador DMP1, característico de osteoblastos recém aprisionados na matriz (ou osteócitos osteóides) (BONEWALD, 2011), foi mais evidente em camundongos CCR2KO que em animais WT, com diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os grupos.

Voltando às funções de TGF- β 1, tal fator também desempenha um papel relevante como regulador da matriz óssea em situações normais, influenciando as propriedades mecânicas do tecido pela regulação da expressão colágeno tipo I (COL1) (BALOOCH et al., 2005; NURDEN, 2011; REINKE; SORG, 2012; BURNOUF

et al., 2013), além de ser um regulador da expressão de diferentes proteínas relacionadas com a organização e mineralização da matriz óssea (HUNTER et al., 1996; BORTON et al., 2001; BALOOCH et al., 2005). Ainda, acredita-se que TGF- β 1 possa reforçar as propriedades da matriz por melhorar a expressão de TIMPs (inibidores de MMPs envolvidas na degradação do colágeno), tal como TIMP-3 (YUAN; VARGA, 2001; LEIVONEN et al., 2013).

Diante de tais funções, nossos resultados foram contrários ao esperado, uma vez que apontaram uma expressão significativamente maior ($p < 0,05$) do marcador de COL1 (mRNA de Col1a2) em animais CCR2KO comparados aos WT, enquanto não foram observadas diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os grupos para a expressão de TIMP-1 e 3 (Figura 21 B). Ainda, tais resultados não se refletiram em diferenças significantes entre os grupos em relação à densidade de matriz óssea (Figura 11 B).

Levando em consideração que a organização estrutural das fibras colágenas influenciam diretamente a microarquitetura do tecido ósseo (BALOOCH et al., 2005), a menor expressão de TGF- β 1 poderia ser suficiente para interferir na qualidade da matriz colagenosa do osso neoformado em camundongos CCR2KO. Assim, por meio de análise de birrefringência também investigamos a organização estrutural das fibras colágenas ao longo do reparo em camundongos CCR2 e WT.

Pelo fato das moléculas de colágeno serem ricas em aminoácidos básicos, estas reagem intensamente com corantes ácidos, como é o caso do Picrosirius Red, promovendo uma evidenciação da birrefringência natural da fibras colágena quando uma luz polarizada passa pelo seu longo eixo (MONTES; JUNQUEIRA, 1991). Dessa forma, as ondas polarizadas dispostas ortogonalmente viajam em velocidades diferentes, resultando em diferentes tonalidades de birrefringência que se relacionam com a quantidade e espessura dos filamentos alinhados (MONTES; JUNQUEIRA, 1991; GARAVELLO-FREITAS et al., 2003; SUGITA; MATSUMOTO, 2013) Dessa forma, a tonalidade da birrefringência emitida por fibras colágenas de diferentes espessuras pode variar da cor verde, indicando fibras mais finas e dispersas, para cor amarela até vermelha, indicando fibras gradativamente mais espessas e organizadas com maior grau de compactação (MONTES, JUNQUEIRA 1991; GARAVELLO-FREITAS et al., 2003). Em nossos resultados, as três tonalidades de birrefringência foram visualizadas em ambos grupos, com padrão

similar na quantidade dos diferentes tipos de fibras presentes nos alvéolos dentais ao longo do reparo ósseo (Figuras 12 e 13). Constatou-se portanto, que camundongos WT e CCR2KO apresentaram um padrão semelhante na organização da matriz colagenosa do tecido ósseo, com predomínio de fibras mais espessas a partir dos 14 dias.

Dessa forma, com base nos resultados dos marcadores RUNX-2, DMP1 e COL1, bem como nos resultados microscópicos da matriz, a menor expressão de TGF- β 1 em camundongos CCR2KO não impactou consideravelmente a diferenciação e atividade osteoblástica nestes animais.

Prosseguindo na investigação dos possíveis papéis de células CCR2+ durante o reparo ósseo alveolar, verificamos por análise molecular e imuno-histoquímica, o recrutamento de macrófagos (em geral) durante o reparo ósseo alveolar em camundongos WT e CCR2KO, e também de células CCR2+ em camundongos WT, para saber principalmente, o quanto essa subpopulação de macrófagos representa (em termos semiquantitativos) em relação ao total de macrófagos que migram para a região do reparo. Conforme observado anteriormente em análise molecular do reparo alveolar em camundongos WT (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013), nossos resultados demonstraram uma marcante expressão de CCR2 (Figura 22 B) e CCL2 (Figura 22 C) no alvéolo dental desses animais. Paralelamente, a análise imuno-histoquímica confirmou a presença de células CCR2+ no alvéolo dental de camundongos WT (Figuras 13 e 15), demonstrando uma evidente marcação nos períodos de 7, 14 e 21 dias, com quantidade estatisticamente maior de células imunomarcadas ($p < 0,05$) no período 7 dias em relação aos tempos posteriores (Figura 18 A e B).

Em seguida, para investigar a possível diminuição ou atraso no recrutamento de macrófagos na região de reparo alveolar em camundongos CCR2KO (devido à ausência de CCR2 nesses animais), realizamos imuno-histoquímica com o marcador F4/80 (específico para detecção de macrófagos em geral) em animais WT e CCR2KO (Figuras 13 e 14). Nossos resultados também demonstraram uma abundante quantidade de macrófagos F4/80+ no alvéolo dental de camundongos WT aos 7 dias, com diminuição significativa nos períodos subsequentes (Figura 19 A). Já no alvéolo dental de animais CCR2KO, observamos uma quantidade significativamente menor de macrófagos F4/80+, com diferenças estatisticamente

significantes ($p < 0,05$) em comparação aos animais WT nos períodos de 7 e 14 dias (Figura 19 A). Adicionalmente, também realizamos imuno-histoquímica para células CCR5+ em camundongos WT e CCR2KO (Figura 13), de modo que uma quantidade marcante de células CCR5+ foram observadas nos alvéolos dentais de camundongos WT aos 7 dias, em contraste com um número reduzido dessas células em animais CCR2KO (Figura 20 A e B).

Nota-se que o recrutamento de macrófagos ocorre nos estágios iniciais do reparo ósseo alveolar em camundongos WT e que o receptor CCR2 desempenha um papel crítico neste processo, uma vez que o recrutamento de macrófagos foi significativamente alterado em animais CCR2KO. Ainda, os diferentes resultados para marcação de células F4/80+ e CCR5+ para ambas linhagens, sugerem que a maior parte dos macrófagos F4/80+ que migram para o reparo ósseo alveolar em camundongos WT são também células duplo positivas para CCR2 e CCR5. Neste contexto, o receptor CCR5 seria o responsável pela migração remanescente, ainda que reduzida, das células F4/80+ nos animais CCR2KO.

Analizamos também a expressão de diferentes receptores de quimiocinas e seus ligantes durante o reparo ósseo alveolar em camundongos WT e CCR2KO. Especificamente em camundongos WT, os níveis de expressão observados para CCR2 e CCL2 foram evidentemente maiores aos níveis verificados para outros receptores de quimiocinas de monócitos/macrófagos, como CCR1 e CCR5, e ligantes relacionados (CCL3, CCL5, CCL7, CCL9) (Figura 22 B e C). Na comparação entre camundongos WT e CCR2KO, embora ambos grupos tenham demonstrado alta expressão para CCR1 e CCR5, níveis significativamente maiores desses receptores foram observados em animais WT (Figura 22 B). Da mesma forma, as quimiocinas CCL12, CCL20 e CCL25, relacionadas à quimioatração de monócitos e linfócitos (MANTOVANI, 1999), apresentaram maiores níveis de expressão nos alvéolos de camundongos WT em relação aos animais CCR2KO (Figura 22 C). Em contrapartida, animais CCR2KO apresentaram uma expressão significativamente maior do receptor CXCR1 (envolvido na migração seletiva de neutrófilos) durante o reparo alveolar, em comparação aos animais WT (Figura 22 B). De fato, expressão das quimiocinas CCL9, CXCL3 e CXCL5 (envolvida na migração de neutrófilos) também foi ligeiramente maior nos alvéolos dentais de camundongos CCR2KO (Figura 22 C). Ainda a expressão de quimiocinas relacionadas ao recrutamento de

monócitos/macrófagos (CCL2, CCL3, CCL5) também foi relativamente maior em camundongos CCR2KO (Figura 22 C).

Considerando a densidade de infiltrado inflamatório verificado no HE, notamos uma cinética regular em animais WT, com diminuição densidade de células aos 14 e 21 dias, embora sem diferenças com os períodos anteriores. Já em camundongos CCR2KO, notamos uma quebra nesse padrão, de modo aos 21 dias a densidade de células inflamatórias aumentou levando à diferença estatisticamente significativa em relação aos animais WT (Figura 10 B). Diante da dificuldade em distinguir macrófagos nesta coloração, as células inflamatórias aqui quantificadas foram principalmente linfócitos e plasmócitos, e eventualmente no período de 7 dias, alguns polimorfonucleares. Possivelmente, ocorreram mecanismos adicionais para o aumento de migração de leucócitos em camundongos CCR2KO, principalmente linfócitos, com o objetivo de contrabalançar uma menor migração de monócitos/macrófagos nestes animais. Além disso, embora nossos resultados mostrem uma maior expressão para o receptor CXCR1, não observamos diferenças histológicas na quantidade de neutrófilos entre os grupos. Mesmo sabendo que tais células exibem uma morfologia distinguível em HE, não poderíamos contudo descartar a presença desse tipo celular nos alvéolos dentais analisados. De fato, em um estudo de reparo de fraturas em camundongos WT e CCR2KO (XING et al., 2010), os autores demonstraram uma abundante quantidade de neutrófilos por meio de marcação imuno-histoquímica (marcador MCA771G) em camundongos CCR2KO comparados aos animais WT.

Mesmo diante das inegáveis evidências de que CCR2/CCL2 é o principal eixo envolvido no recrutamento de monócitos/macrófagos durante o reparo ósseo alveolar, deve-se admitir que embora em quantidades menores, macrófagos foram ainda recrutados para o ambiente de reparo alveolar em camundongos CCR2KO. Além disso, na ausência de CCR2, mecanismos compensatórios podem ter sido acionados no ambiente de reparo de camundongos CCR2KO, dada a expressão estatisticamente maior para CXCR1, bem como o ligeiro aumento na expressão de quimiocinas para monócitos/macrófagos nos alvéolos destes animais. Contudo, os pontos que discutiremos na sequência envolvem principalmente esta subpopulação de monócitos/macrófagos CCR2+, que (por motivos óbvios) está ausente em camundongos CCR2KO.

Analizando outros modelos de reparo tecidual em camundongos, estudos recentes também demonstram uma significativa diminuição do recrutamento de macrófagos F4/80+ no local da lesão em camundongos CCR2KO comparados aos animais WT, de modo que, a ausência de células CCR2+ alterou a regeneração da musculatura esquelética (LU et al., 2011), o reparo ósseo em fraturas de tíbias (XING et al., 2010) e cicatrização em injúrias da pele (WILLENBORG et al., 2012). De acordo ainda com Willenborg et al. (2012), em análise por FACS os autores confirmaram que de todos os monócitos/macrófagos que migram para o sítio de reparo, a maioria constitui uma subpopulação de células CCR2+.

Guardadas as diferenças dos modelos experimentais, as comparações dos eventos biológicos analisados no reparo tecidual entre camundongos CCR2KO e WT nestes estudos, demonstram que células CCR2+ (em camundongos WT) tem um papel importante na fagocitose de resíduos teciduais (LU et al., 2011), bem como na vascularização da lesão por meio da produção de fatores angiogênicos (XING et al., 2010; WILLENBORG et al., 2012). De fato, tem sido descrito que macrófagos de uma forma em geral desempenham um papel importante do reparo/regeneração dos tecidos por meio dessas funções (PARK; BARBUL, 2004; WILLENBORG et al., 2012). Assim, células CCR2+ poderiam ter um papel significativo na substituição do tecido conjuntivo por tecido ósseo e no desenvolvimento de vasos sanguíneos durante o reparo ósseo alveolar em camundongos.

Considerando inicialmente a substituição do tecido conjuntivo por tecido ósseo, analisamos isoladamente os parâmetros de tecido conjuntivo, considerando especialmente aqui fibras colágenas e fibroblastos. Vale lembrar que o parâmetro fibras colágenas abrangeu exclusivamente as fibras presentes na matriz extracelular do tecido conjuntivo (da matriz conjuntiva e não da matriz óssea). Dessa forma, aos 7 dias notou-se maior densidade de fibroblastos ($p < 0,05$) nos animais CCR2KO comparados aos WT, em diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os grupos no parâmetro fibras colágenas (Figura 10 D e E). Já aos 14 dias a densidade de fibroblastos e fibras colágenas foi maior ($p < 0,05$) em camundongos WT comparando-se com camundongos CCR2KO (Figura 10 D e E). De forma coerente, ambos grupos apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de fibroblastos e fibras colágenas ao longo dos períodos experimentais. Considerando a cinética, a densidade de fibras colágenas (matriz conjuntiva) diminuiu significativamente

($p < 0,05$) a partir dos 14 dias em camundongos WT e CCR2KO (Figura 10 E), enquanto densidade de matriz óssea aumentou ($p < 0,05$) (Figura 11 B); um evento já esperado, dada a substituição gradativa de matriz conjuntiva por matriz óssea (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013). Entretanto, um resultado que chamou a atenção em relação à densidade de fibras colágenas, é que mesmo tendo diminuído, os valores verificados em camundongos CCR2KO aos 21 dias foram estatisticamente maiores ($p < 0,05$) comparados aos verificados em animais WT.

Embora esse resultado não tenha impactado o reparo ósseo alveolar em camundongos CCR2KO, o mesmo sugere um indício da função de células CCR2+ na substituição do tecido conjuntivo por tecido ósseo durante o reparo. Ou seja, a diminuição no recrutamento de macrófagos F4/80+ para o alvéolo dental de camundongos CCR2KO, pode ter refletido em um ligeiro atraso na degradação da matriz conjuntiva nos períodos posteriores. Ou alternativamente, tal diferença na densidade de fibras colágenas entre ambos grupos, poderia estar relacionada a uma maior expressão de COL1 nos alvéolos dentais de camundongos CCR2KO nos períodos mais tardios do reparo.

A sugestão que poderia anular essa segunda hipótese reside no fato de que, mesmo com maior expressão de COL1 observada em camundongos CCR2KO, não foram observadas diferenças na densidade e qualidade da matriz orgânica do tecido ósseo desses animais em relação aos camundongos WT. Além disso, em estudos prévios, a expressão COL1 diminui consideravelmente aos 21 dias nos alvéolos de camundongos WT (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013). Dessa forma, embora não tenhamos a cinética para expressão de COL1 em camundongos CCR2KO, sabe-se alta expressão desta molécula ocorre possivelmente por osteoblastos nos períodos iniciais do reparo em animais WT, estando diretamente relacionada formação da matriz óssea aos 7 e 14 dias (Figura 11 B). Como em nossas análises esses eventos histológicos foram semelhantes entre camundongos WT e CCR2KO, possivelmente a maior expressão de COL1 também tenha se concentrado nos períodos iniciais. Além disso, uma expressão significativamente maior de MMP-1a (colagenase envolvida principalmente degradação de COL1), foi observada em camundongos CCR2KO em relação aos animais WT, fato que pode ter contribuído para melhorar as condições de reparo em animais CCR2KO, fazendo com o processo seguisse de forma adequada mesmo com a deficiência de macrófagos

nestes animais. Dessa forma, acredita-se que a subpopulação de células CCR2+, contribua parcialmente com a substituição tecidos conjuntivo por ósseo durante o reparo ósseo alveolar.

Em relação ao papel de células CCR2+ no processo de angiogênese durante o reparo ósseo alveolar, observamos uma alta expressão de VEGF (VEGFa e VEGFb) para ambos grupos, sem diferenças significantes. Já a densidade de vasos sanguíneos foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) em camundongos CCR2KO em relação aos animais WT aos 14 dias, embora aos 21 dias a densidade de vasos tenha declinado em camundongos CCR2KO e aumentado significativamente ($p < 0,05$) em camundongos WT. Dessa forma, uma futura comparação da cinética da expressão de VEGF em camundongos CCR2KO e WT pode contribuir para compreensão dos mecanismos regulatórios que levaram a essas diferenças. Contrário ao observado em outros trabalhos (XING et al., 2010; WILLENBORG et al., 2012), em nosso estudo a ausência de células CCR2+, bem como a menor quantidade de macrófagos no início do reparo, não prejudicou o processo de angiogênese em animais CCR2KO. Contudo, outras células como osteoblastos e células endoteliais também expressam VEGF e contribuem para angiogênese no reparo ósseo (BAO et al., 2009; STREET; LENEHAN, 2009; LEE et al., 2014). Vale ressaltar que, não podemos descartar as notáveis diferenças entre os tecidos/modelos estudados nestes outros trabalhos (XING et al., 2010; WILLENBORG et al., 2012) utilizados para comparação com nosso estudo.

Na sequência, analisamos o possível papel de células CCR2+ na produção ou ainda, na regulação da produção de citocinas durante o reparo ósseo alveolar, por meio da expressão dessas moléculas no alvéolo dental de camundongos WT e CCR2KO. Considerando trabalhos anteriores, notou-se que IL-10, TNF- α e IL-6 tem seu pico de expressão aos 7 dias no reparo alveolar de camundongos WT, regredindo gradativamente nos períodos posteriores (FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013). Acredita-se que o próprio trauma tecidual decorrente da exodontia pode levar a uma alta expressão de TNF- α e IL-6 no alvéolo dental destes animais, contribuindo significativamente para ativação da resposta imune, enquanto IL-10 é responsável por modular tal resposta (CARDOSO et al., 2010; FRANCISCONI, 2013; VIEIRA, 2013). Neste contexto, sabe-se ainda que moléculas decorrentes do trauma tecidual (DAMPs - padrões moleculares associados ao dano) ligam-se em receptores

específicos na sua superfície de macrófagos (TLR, receptor semelhante a Toll) induzindo a polarização destas células para um fenótipo inflamatório produtor citocinas pró-inflamatórias clássicas, tal como TNF- α (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Em nosso estudo, IL-10 foi altamente expressa em ambos grupos, sem diferenças significantes entre eles. Já a expressão de TNF- α foi significativamente menor ($p < 0,05$) em camundongos CCR2KO em comparação aos camundongos WT, embora animais CCR2KO também tenham apresentado altos níveis de expressão para tal citocina. Ou seja, células CCR2+ parecem constituir uma fonte adicional de TNF- α durante o reparo alveolar em camundongos, concordando com o fato de que células CCR2+ tendem a um fenótipo inflamatório, sendo importantes na resposta imune/inflamatória num contexto geral (MANTOVANI, 1999; GEISSMANN; JUNG; LITTMAN, 2003; SHI; PAMER, 2011).

Considerando ainda que TNF- α tem um papel inibidor sobre a expressão RUNX-2 *in vitro*, interferindo na diferenciação de osteoblastos a partir de MSCs (KOTAKE; NANKE, 2014), sua maior expressão em camundongos WT pode ter contribuído para regular os efeitos da maior expressão de TGF- β 1 neste animais. Da mesma forma, a menor expressão de TNF- α em camundongos CCR2KO pode ter compensado a diferença de expressão de TGF- β 1 e RUNX-2 entre animais WT e CCR2KO.

Em relação à IL-6, níveis significativamente maiores de expressão ($p < 0,05$) foram observados em camundongos CCR2KO em comparação a animais WT. Tal resultado sugere também um mecanismo compensatório da ativação da resposta imune em camundongos CCR2KO diante da deficiência de macrófagos, assim como verificado nos resultados da expressão de receptores de quimiocinas. Considerando ainda que IL-6 está criticamente envolvida com o recrutamento de neutrófilos na resposta aguda inicial (FIELDING et al., 2008), além de favorecer a sobrevivência dessas células no ambiente inflamatório por mecanismos anti-apoptóticos (ASENSI et al., 2004; FIELDING et al., 2008), a maior expressão de IL-6 em camundongos CCR2KO demonstra uma correlação positiva com a maior expressão de CXCR1 nestes animais.

Como também tem sido demonstrado, citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α e IL-1 β) tem um papel crucial na indução da osteoclastogenese *in vivo* (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; TAKAYANAGI, 2007; VIEIRA, 2013). Neste sentido,

embora as citocinas analisadas possam ter participado da modulação da osteoclastogênese durante o reparo alveolar em camundongos WT e CCR2KO, as diferenças na expressão de TNF- α e IL-6 entre os grupos não demonstraram uma clara correlação com as diferenças nos resultados moleculares e histológicos observados para osteoclastos em nosso estudo. Sem dúvida, a deficiência na expressão de CCR2 em camundongos CCR2KO foi possivelmente o principal fator relacionado aos nossos resultados mais intrigantes em relação aos osteoclastos.

Neste contexto, sabendo que diferentes pesquisas em osteoimunologia, apontam o eixo CCL2/CCR2 como importante para o recrutamento e a diferenciação de osteoclastos (KIM; DAY; MORRISON, 2005; LU; KANG, 2009; XING et al., 2010; TADDEI et al., 2012), esperávamos encontrar uma menor densidade de osteoclastos no alvéolo em reparo de camundongos CCR2KO, seguida de uma menor reabsorção da matriz óssea nestes animais. De modo contrário, a densidade de osteoclastos no reparo alveolar em animais CCR2KO foi significativamente maior ($p < 0,05$) aos 14 e 21 dias comparada a densidade verificada em camundongos WT, em concordância com uma maior ($p < 0,05$) expressão de RANK/RANKL em animais CCR2KO. De fato, considerando que OPG teve um padrão similar de expressão entre os grupos, a proporção entre RANKL/OPG aponta para maior osteoclastogênese em camundongos CCR2KO. Considerando a maior densidade de osteoblastos em camundongos CCR2KO aos 21 dias, tal diferença pode ter correlação com a maior expressão de RANKL nestes animais, e consequentemente maior osteoclastogênese. Por outro lado, dadas as evidências de que CCR2 é importante para o recrutamento de precursores de osteoclastos, a maior densidade de osteoclastos em camundongos CCR2KO, também poderia ser um reflexo de um possível atraso/deficiência na apoptose dessas células, na tentativa de compensar o menor recrutamento de precursores nestes animais.

Considerando a funcionalidade dos osteoclastos presentes em camundongos CCR2KO, observamos que o maior número dessas células não se refletiu na diminuição da matriz óssea nestes animais. Além disso, a expressão para CTSK, um marcador de atividade de osteoclastos, foi significativamente menor ($p < 0,05$) em camundongos CCR2KO em relação aos animais WT.

Diante dessas evidências, sugere-se que CCR2 tenha um papel na ativação de osteoclastos durante o reparo ósseo alveolar, de modo que a densidade

significativamente maior ($p < 0,05$) de osteoclastos nos alvéolos dentais de camundongos CCR2KO, pode representar uma compensação da suposta ineficiência reabsortiva dessas células na ausência de sinalização via CCL2/CCR2. De fato, estudos *in vitro* demonstram que o eixo CCL2/CCR2 parece ter uma contribuição parcial tanto na fusão de monócitos em células multinucleadas (em conjunto com MCS-F e RANKL), como na expressão de TRAP (KIM; DAY; MORRISON, 2005). Desse modo, acreditamos que uma futura marcação para atividade de TRAP nos osteoclastos presentes no reparo ósseo alveolar em camundongos WT e CCR2KO, possa contribuir para comprovar essas evidências.

Por fim, também investigamos o perfil de expressão das metaloproteases MMP-2 e MMP9 durante o reparo alveolar, além da MMP-1a já discutida. De um modo geral, observamos uma expressão significativamente maior ($p < 0,05$) de MMP-1a, MMP-2 e MMP9 nos alvéolos dentais de camundongos CCR2KO em comparação aos animais WT. Tais MMPs apresentam distintas e importantes funções aplicáveis aos eventos ocorridos no reparo ósseo, de modo que a alta expressão dessas moléculas nos alvéolos dentais de camundongos WT e CCR2KO, além das diferenças estatisticamente significantes observadas entre tais linhagens, poderiam configurar uma relação de causa ou efeito para os diferentes resultados moleculares e teciduais discutidos neste estudo.

MMPs são primariamente reconhecidas pela sua capacidade de degradação e consequente remodelação da matriz extracelular (RODRÍGUEZ; MORRISON; OVERALL, 2010), de modo especialmente MMP-1a (reconhecida pela sua alta capacidade de degradar COL1), é altamente expressa no período de 7 dias durante o reparo alveolar em camundongos WT (VIEIRA, 2013). Da mesma forma, embora essa não seja a principal função atribuída às gelatinases MMP-2 e MMP9, tais moléculas também podem atuar na degradação do COL1, fato que também pode ter contribuído para adequada substituição e remodelação dos tecidos no alvéolo em camundongos CCR2KO, resultando em um reparo similar ao observado em animais WT.

Especialmente MMP9, é altamente expressa por osteoclastos (REPONEN et al., 1994; LU; RABIE, 2006), e de forma interessante, também está associada à migração de (pré)osteoclastos para os sítios de reabsorção e à fusão de células TRAP+ (BLAVIER; DELAISSE, 1995; NYMAN et al., 2011). Frente à exposição a

estímulos quimiotáticos, monócitos e linfócitos T também expressam MMP9, facilitando o recrutamento dessas células para o sítio de inflamação (ZHOU et al., 1993; LEPPERT et al., 1995; SZABOA; ABLINB; SINGHA, 2004). De acordo com tais evidências, a maior expressão de MMP9 nos alvéolos de camundongos CCR2KO podem ter refletido em uma maior atividade migratória de (pré) osteoclastos, como de outras células inflamatórias para o ambiente de reparo desses animais. De fato, conforme já demonstrado na análise histomorfométrica, tanto a densidade de osteoclastos (aos 14 e 21 dias), quanto de infiltrado inflamatório (21 dias), foram significativamente maiores em animais CCR2KO comparados aos WT.

Adicionalmente, MMPs em geral tem um papel importante no processo inflamatório e também no reparo tecidual, devido à sua atividade regulatória sobre diferentes fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, por meio de clivagem dessas moléculas, inativando-as ou ativando-as dependendo de cada especificidade. No caso de MMP1, 2 e 9, sabe-se que tais moléculas aumentam a disponibilidade e bioatividade de TGF- β 1 e VEGFa por processar proteínas que tornam essas moléculas latentes (DALLAS et al., 1995; MAEDA et al., 2002; COLNOT et al., 2003; HÉROULT et al., 2004; RODRÍGUEZ; MORRISON; OVERALL, 2010). De fato, a maior expressão dessas enzimas nos alvéolos dentais camundongos CCR2KO podem ter compensado a menor expressão de TGF- β 1 nestes animais, otimizando a bioatividade e biodisponibilidade das moléculas secretadas.

Diante dos resultados apresentados aqui, observa-se que células CCR2+ participam de diferentes etapas do processo de reparo alveolar, com destaques para sua influência no recrutamento/diferenciação de células osteoprogenitoras, na regulação da resposta inflamatória e na osteoclastogênese. Dessa forma, acredita-se que o conjunto de evidências levantadas no presente trabalho, poderão colaborar com a atual compreensão dos múltiplos papéis indicados para células CCR2+ no sistema osteoimune, e mais especificamente, com o entendimento dos mecanismos imunológicos que regulam o processo de reparo ósseo alveolar.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, concluímos que:

- A ausência de células CCR2+ resultou em alterações transitórias no reparo ósseo alveolar em camundongos CCR2KO, especificamente nos parâmetros de infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos, fibroblastos, fibras colágenas, osteoblastos e osteoclastos.
- A ausência de células CCR2+ resultou em diminuição de células F4/80+ no infiltrado inflamatório ao longo do processo de reparo ósseo alveolar, demonstrando o papel do receptor CCR2 no recrutamento de macrófagos (células F4/80+), possivelmente pelo eixo CCL2/CCR2.
- A ausência de células CCR2+ resultou em diminuição de células CCR5+ no infiltrado inflamatório ao longo do processo de reparo ósseo alveolar, sugerindo que as células F4/80+ apresentam dupla positividade para os receptores CCR2 e CCR5. Neste contexto, o receptor CCR5 seria o responsável pela migração remanescente, ainda que reduzida, das células F4/80+ nos animais CCR2KO.
- Em termos moleculares, a ausência de células CCR2+ resultou na alteração da expressão de diferentes marcadores moleculares, tais como: o fator de crescimento TGF- β 1, marcadores de matriz COL1, MMP1a, MMP2 e MMP9, marcadores ósseos RUNX2, DMP1, RANKL, RANK e CTSK, e marcadores de MSCs CD106, OCT-4, NANOG, CD146 e CD105, bem como de marcadores imunológicos como as citocinas IL-6 e TNF- α , receptores de quimiocinas CCR1, CCR5 e CXCR1, e as quimiocinas CCL12, CCL20, CCL25 e CXCL12.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. 592 p.
- Aggarwal R, Ghobrial IM, Roodman GD. Chemokines in multiple myeloma. *experimental hematology*. 2006;34(10):1289-95.
- Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res*. 2008; 87(2):107-18.
- Aiello RJ, Perry BD, Bourassa PA, Robertson A, Weng W, Knight DR, et al. CCR2 receptor blockade alters blood monocyte subpopulations but does not affect atherosclerotic lesions in apoE^{-/-} mice. *Atherosclerosis*. 2010;208(2):370-5.
- Alexander KA, Chang MK, Maylin ER, Kohler T, Müller R, Wu AC, et al. Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. *J Bone Miner Res*. 2011;26(7):1517-32.
- Andrade J Jr, Taddei SRA, Garlet GP, Garlet TP, Teixeira AL, Silva TA, et al. CCR5 Down-regulates Osteoclast Function in Orthodontic Tooth Movement. *J Dent Res*. 2009;88:1037.
- Ang E, Pavlos NJ, Rea SL, Qi M, Chai T, Walsh JP, et al. Proteasome inhibitors impair RANKL-induced NF-kappaB activity in osteoclast-like cells via disruption of p62, TRAF6, CYLD, and IkappaBalpha signaling cascades. *J Cell Physiol*. 2009;220(2):450-9.
- Asensi V, Valle E, Meana A, Fierer J, Celada A, Alvarez V, et al. In vivo interleukin-6 protects neutrophils from apoptosis in osteomyelitis. *Infect Immun*. 2004;72(7):3823-8.
- Bais MV, Wigner N, Young M, Toholka R, Graves DT, Morgan EF, et al. BMP2 is essential for post natal osteogenesis but not for recruitment of osteogenic stem cells. *Bone*. 2009;45(2):254-66.
- Balooch G, Balooch M, Nalla RK, Schilling S, Filvaroff EH, Marshall GW, et al. TGF-beta regulates the mechanical properties and composition of bone matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(52):18813-8.
- Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*. 2009;153(2):347-58.

- Behl Y, Siqueira M, Ortiz J, Li J, Desta T, Faibish D, et al. Activation of the acquired immune response reduces coupled bone formation in response to a periodontal pathogen. *J Immunol*. 2008;181(12):8711-8.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*. 1995;57(1):289-300.
- Blavier L, Delaissé JM. Matrix metalloproteinases are obligatory for the migration of preosteoclasts to the developing marrow cavity of primitive long bones. *J Cell Sci*. 1995;108(12):3649-59.
- Bodner L, Kaffe I, Littner MM, Cohen J. Extraction site healing in rats: a radiologic densitometric study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1993;75(3):367-72.
- Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol*. 2001;11(2):66-75.
- Bogdan C. The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr Opin Immunol*. 2000;12(4):419-24.
- Bokoch GM. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*. 1995;86(5):1649-60.
- Bonewald LF. The Amazing Osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011;26(2):229-38.
- Borton AJ, Frederick JP, Datto MB, Wang XF, Weinstein RS. The loss of Smad3 results in a lower rate of bone formation and osteopenia through dysregulation of osteoblast differentiation and apoptosis. *J Bone Miner Res*. 2001;16(10):1754-64.
- Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1468-86.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.
- Burnouf T, Goubran HA, Chen TM, Ou KL, El-Ekiaby M, Radosevic M. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Rev*. 2013;27(2):77-89.
- Cardoso CL, Rodrigues MTV, Júnior OF, Garlet GP, De Carvalho PSP. Clinical concepts of dry socket. *J Maxillofac Oral Surg*. 2010;68(8):1922-32.

Cardoso CL. Análise morfológica e molecular da alveolite induzida em ratos com diferentes modalidades de tratamento [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2009.

Cardoso CR, Garlet GP, Crippa GE, Rosa AL, Júnior WM, Rossi MA, et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24(1):1-6.

Carvalho ACP, Okamoto T. Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados à clínica; *Oral Surgery: Experimental Basis to Clinical Application*. 1987.

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25(11):2739-49.

Chang MK, Raggatt LJ, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, et al. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J Immunol*. 2008;181(2):1232-44.

Chen G, Deng C, Li Y. TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation *Int. J Biol Sci*. 2012;8(2):272-88.

Colnot C, Thompson Z, Miclau T, Werb Z, Helms JA. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development*. 2003;130(17):4123-33.

Conti P, DiGioacchino M. MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc*. 2001;22:133-7.

Dallas SL, Miyazono K, Skerry TM, Mundy GR, Bonewald LF. Dual role for the latent transforming growth factor-beta binding protein in storage of latent TGF-beta in the extracellular matrix and as a structural matrix protein. *J Cell Biol*. 1995;131:539-49.

Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell and more. *Endocr Rev*. 2013;34(5):658-90.

Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*. 2008;61(5):577-87.

Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ*. 2003;67(8):932-49.

- de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Garlet GP, de Souza RF, Taba M, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol.* 2009;80(1):98-105.
- Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.* 2005;36(12):1392-404.
- Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2003;17(9):984-92.
- Duong LT, Rodan GA. Regulation of osteoclast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord.* 2001;2(1):95-104.
- Elsubeihi ES, Heersche JNM. Quantitative Assessment of post-extraction healing and alveolar ridge remodelling of the mandible in female rats. *Arch Oral Biol.* 2004;49(5):401-12.
- Eriksen FE. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010;11(4):219-27.
- Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res.* 2000;55:15-35.
- Fielding CA, McLoughlin RM, McLeod L, Colmont CS, Najdovska M, Grail D, et al. IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. *J Immunol.* 2008;181(3):2189-95.
- Francisconi CF. Caracterização morfológica e molecular do papel da iNOS no processo de reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas e infecciosas [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2013.
- Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn.* 2006;235(1):176-90.
- Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(5):230-6.
- Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Hofling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2003 May-Jun;70(2):81-9.

Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS. The dual role of p55 tumour necrosis factor- α receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol*. 2007a;147(1):128-38.

Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Garlet TP, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, Silva JS. The essential role of IFN- γ in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microbes Infect*. 2008a;10(5):489-96.

Garlet GP, Cardoso CR, Campanelli AP, Martins W Jr, Silva JS. Expression of suppressors of cytokine signaling in diseased periodontal tissues: a stop signal for disease progression? *J Periodontal Res*. 2006a;41(6):580-4.

Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol*. 2006b;21(1):12-20.

Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. "Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2004;31(8):671-9.

Garlet GP. Participação de citocinas na imunomodulação de doença periodontal experimental induzida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [tese]. Ribeirão Preto (SP):Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2004.

Garlet TP, Coelho U, Repeke CE, Silva JS, Cunha Fde Q, Garlet GP. Differential expression of osteoblast and osteoclast chemmoattractants in compression and tension sides during orthodontic movement. *Cytokine*. 2008b;42(3):330-5.

Garlet TP, Coelho U, Silva JS, Garlet GP. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J Oral Sci*. 2007b;115(5):355-62.

Garlet TP, Fukada SY, Saconato IF, Avila-Campos MJ, da Silva TA, Garlet GP, et al. CCR2 Deficiency Results in Increased Osteolysis in Experimental Periapical Lesions in Mice. *J Endod*. 2010;36(2):244-50.

Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19:71-82.

- Glowacki AJ, Yoshizawa S, Jhunjhunwala S, Vieira AE, Garlet GP, Sfeir C, et al. Prevention of inflammation-mediated bone loss in murine and canine periodontal disease via recruitment of regulatory lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov 12;110(46):18525-30.
- Goldring MB. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep*. 2000;2(6):459-65.
- Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003;74(3):391-401.
- Graves DT, Jiang Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995;6(2):109-18.
- Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 2011;3:10.
- Herman S, Kronke G, Schett G. Molecular mechanisms of inflammatory bone damage: emerging targets for therapy. *Trends Mol Med*. 2008;14(6):245-53.
- Hérault M, Bernard-Pierrot I, Delbé J, Hamma-Kourbali Y, Katsoris P, Barritault D et al. Heparin affinity regulatory peptide binds to vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *Oncogene*. 2004 Mar 4;23(9):1745-53.
- Hirvonen MJ, Fagerlund K, Lakkakorpi P, Kalervo Väänänen H, Mulari MTK. Novel perspectives on the transcytotic route in osteoclasts. *BoneKEY Reports*. 2013;13:2 (306).
- Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001;12(1):9-18.
- Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J*. 1996;317:59-64.
- Jia T, Serbina NV, Brandl K, Zhong MX, Leiner IM, Charo IF. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*. 2008;180:6846-53.
- Jones E, Yang X. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: Current status. *Injury*. 2011;42(6):562-8.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* 2002;8(3):147-59.

Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral: texto, atlas, correlações clínicas.* 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.

Kim MS, Day CJ, Morrison NA. MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation. *J Biol Chem.* 2005;280(16):16163-9.

Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The Osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(1):1-8.

Korpi JT, Åström P, Lehtonen N, Tjäderhane L, Kallio-Pulkkinen S, Siponen M, et al. Healing of extraction sockets in collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8)-deficient mice. *Eur J Oral Sci.* 2009;117(3):248-54.

Kotake S, Nanke Y. Effect of TNF α on osteoblastogenesis from mesenchymal stem cells. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(3):1209-13.

Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med.* 1997;186:1757-62.

Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, Park HD, Kang AR, Kyung HM, et al. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J Biol Chem.* 2003;278(36):34387-94.

Lee YA, Ji HI, Lee SH, Hong SJ, Yang HI, Chul Yoo M. The role of adiponectin in the production of IL-6, IL-8, VEGF and MMPs in human endothelial cells and osteoblasts: implications for arthritic joints. *Experimental & Molecular Medicine.* 2014;17;46:e72.

Leivonen SK, Lazaridis K, Decock J, Chantry A, Edwards DR, Kähäri VM. TGF- β -Elicited Induction of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP)-3 Expression in Fibroblasts Involves Complex Interplay between Smad3, p38 α , and ERK1/2. *PLoS One.* 2013;8(2).

Leppert D, Waubant E, Galaray R, Bunnett NW, Hauser SL. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J Immunol.* 1995;154:4379-89.

Li Y, Toraldo G, Li A, Yang X, Zhang H, Qian WP, et al. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood* 2007;109(9):3839-48.

- Lorenzo J, Choi Y, Horowitz M, Takayanagi H. Overview: The developing field of osteoimmunology. *Osteoimmunology: interactions of the immune and skeletal systems*. 2011.
- Lu H, Huang D, Saederup N, Charo IF, Ransohoff RM, Zhou L. Macrophages recruited via CCR2 produce insulin-like growth factor-1 to repair acute skeletal muscle injury. *FASEB J*. 2011;25(1):358-69.
- Lu M, Rabie AB. Matrix metalloproteinase-9 regulates graft bone resorption. *Angle Orthod*. 2006;76:598-604.
- Lu X, Kang Y. Chemokine (C-C motif) ligand 2 engages CCR2+ stromal cells of monocytic origin to promote breast cancer metastasis to lung and bone. *J Biol Chem*. 2009;284(42):29087-96.
- Maeda S, Dean DD, Gomez R, Schwartz Z, Boyan BD. The first stage of transforming growth factor beta1 activation is release of the large latent complex from the extracellular matrix of growth plate chondrocytes by matrix vesicle stromelysin-1 (MMP-3). *Calcif Tissue Int*. 2002;70:54-65.
- Manolagas SC. Birth and Death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000;21(2):115-37.
- Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today*. 1999;20(6):254-7.
- Miller RE, Tran PB, Das R, Ghoreishi-Haack N, Ren D, Miller RJ, et al. CCR2 chemokine receptor signaling mediates pain in experimental osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(50):20602-7.
- Montes GS, Junqueira LC. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991;86 Suppl 3:1-11.
- Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958-69.
- Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008;14(2):179-86.
- Muller WA. New mechanisms and pathways for monocyte recruitment. *J Exp Med*. 2001;194, F47-51.
- Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):723-37.

Nanci A. Ten Cate, histologia oral. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. 400 p.

Nicks KM, Perrien DS, Akel NS, Suva LJ, Gaddy D. Regulation of osteoblastogenesis and osteoclastogenesis by the other reproductive hormones, Activin and Inhibin. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;30(1-2):11-20.

Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2011;Suppl 1:S13-33.

Nyman JS, Lynch CC, Perrien DS, Thiolloy S, O'Quinn EC, Patil CA, et al. Differential Effects Between the Loss of MMP-2 and MMP-9 on Structural and Tissue-Level Properties of Bone. *J Bone Miner Res.* 2011;26(6):1252-60.

Okamoto T, de Russo M. Wound healing following tooth extraction. histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Aracatuba.* 1973;2(2):153-69.

Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg.* 2004;187(5A):11S-6.

Pierantozzi E, Gava B, Manini I, Roviello F, Marotta G, Chiavarelli M, et al. Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. *Stem cells and development.* 2011;20(5):915-23.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.

Poleti ML. Análise morfométrica, radiográfica e molecular do processo de reparo alveolar após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em ratos [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2009.

Réaux-Le Goazigo A, Van Steenwinckel J, Rostène W, Mélik Parsadaniantz S. Current status of chemokines in the adult CNS. *Prog Neurobiol.* 2013 May;104:67-92.

Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49:35-43.

Repeke CE, Ferreira SB, Claudino M, Silveira EM, de Assis GF, Avila-Campos MJ, et al. Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKLI+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. *Bone.* 2010;46(4):1122-30.

Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I, Tryggvason K. High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *J Cell Biol.* 1994 Mar;124(6):1091-102.

- Rigamonti E, Fontaine C, Lefebvre B, Duhem C, Lefebvre P, Marx N, et al. Induction of CXCR2 receptor by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;28:932-9.
- Rodrigues MTV. Análise microscópica e histométrica comparativa da aplicação de uma pasta à base de metronidazol e da irrigação com iodeto de sódio e peróxido de hidrogênio para o tratamento de alvéolos dentários infectados de ratos [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2007.
- Rodríguez D, Morrison CJ, Overall CM. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(1):39-54.
- Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 2008;18:217-42.
- Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(5):459-66.
- Schroeder JE, Mosheiff R. Tissue engineering approaches for bone repair: concepts and evidence. *Injury.* 2011;42(6):609-13.
- Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:421-52.
- Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):762-74.
- Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012;122(3):787-95.
- Silva T, Garlet GP, Fukada S, Silva J, Cunha F. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res.* 2007;86(4):306-19.
- Silva TA, Garlet GP, Lara VS, Martins W Jr, Silva JS, Cunha FQ. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol.* 2005;20(5):310-6.
- Sozzani S, Locati M, Allavena P, Van Damme J, Mantovani A. Chemokines: a superfamily of chemotactic cytokines. *Int J Clin Lab Res.* 1996;26(2):69-82.
- Stefater JA 3rd, Ren S, Lang RA, Duffield JS. Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration. *Trends Mol Med.* 2011;17(12):743-52.

- Street J, Lenehan B. Vascular endothelial growth factor regulates osteoblast survival evidence for an autocrine feedback mechanism. *J Orthop Surg Res*. 2009;16(4):19.
- Sugita S, Matsumoto T. Quantitative measurement of the distribution and alignment of collagen fibers in unfixed aortic tissues. *J Biomech*. 2013;46(7):1403-7.
- Szabo KA, Ablin RJ, Singha G. Matrix metalloproteinases and the immune response. *Clinical and Applied Immunology Reviews*. 2004;295-319.
- Tachi K, Takami M, Sato H, Mochizuki A, Zhao B, Miyamoto Y, et al. Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced ectopic bone formation by transforming growth factor- β 1. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(5-6):597-606.
- Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, et al. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 2007;117(1):185-94.
- Taddei SR, Andrade I Jr, Queiroz-Junior CM, Garlet TP, Garlet GP, Cunha Fde Q, et al. Role of CCR2 in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2012;141(2):153-60.
- Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontal Res*. 2005;40(4):287-93.
- Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(4):292-304.
- Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000;289(5484):1504-8.
- Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANKL and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:795-823.
- Thomas MV, Puleo DA. Infection, inflammation, and bone regeneration: a paradoxical relationship. *J Dent Res*. 2011;90(9):1052-61.
- Tomomatsu N, Aoki K, Alles N, Soysa NS, Hussain A, Nakachi H, et al. LPS-Induced Inhibition of Osteogenesis is TNF-alpha-Dependent in a Murine Tooth Extraction Model. *J Bone Miner Res*. 2009;24(10):1770-81.
- Trombone AP, Ferreira SB Jr, Raimundo FM, de Moura KC, Avila-Campos MJ, Silva JS, et al. Periodontitis in mice selected for maximal or minimal inflammatory reactions: increased inflammatory immune responsiveness drives increased alveolar bone loss without enhancing the control of periodontal infection. *J Periodontal Res*. 2009;44(4):443-51.

- Trubiani O, Isgro A, Zini N, Antonucci I, Aiuti F, Di Primio R, et al. Functional interleukin-7/interleukin-7Ralpha, and SDF-1alpha/CXCR4 are expressed by human periodontal ligament derived mesenchymal stem cells. *Journal of cellular physiology*. 2008;214(3):706-13.
- Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet*. 2006;38(12):1424-9.
- Väänänen HK, Liu Y-K, Lehenkari P, Uemara T. How do osteoclasts resorb bone? *Mater Sci Eng C*. 1998;6:205-9.
- Vieira AE. Caracterização morfológica e molecular do papel de citocinas pró e anti-inflamatórias no processo de reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas e infecciosas [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2013.
- Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006;12(1):17-25.
- Walsh NC, Gravallesse EM. Bone remodeling in rheumatic disease: a question of balance. *Immunological Reviews*. 2010;233(1):301-12.
- Wang L, Zhao Y, Shi S. Interplay between mesenchymal stem cells and lymphocytes: implications for immunotherapy and tissue regeneration. *J Dent Res*. 2012;91(11):1003-10.
- Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol*. 1969;26:235-302.
- Willenborg S, Lucas T, van Loo G, Knipper JA, Krieg T, Haase I, Brachvogel B, et al. CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood*. 2012 Jul 19;120(3):613-25.
- Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, Barbier V, Nowlan B, Helwani F, et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood*. 2010;116(23):4815-28.
- Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):509-28.
- Xing Z, Lu C, Hu D, Yu Y, Wang X, Colnot C, et al. Multiple roles for CCR2 during fracture healing. *Dis Model Mech*. 2010;3(7-8):451-8.

Yuan W, Varga J. Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *J Biol Chem.* 2001;276(42):38502-10.

Zhou H, Bernhard EJ, Fox FE, Billings PC. Induction of metalloproteinase activity in human T-lymphocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1177:174-8.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Densidade de área (%) de Coágulo sanguíneo e Outras estruturas nos alvéolos dentais de camundongos WT e CCR2KO ao longo dos períodos experimentais pós-exodontia

período	grupo	Coágulo sanguíneo		Outras estruturas	
		WT	CCR2KO	WT	CCR2KO
0 hora		77,43±11,49	83,59±9,47	19,29±10,84	13,38±9,28
7 dias		4,13±2,97	5,97±5,94	2,05±1,68	1,18±1,48
14 dias		0,00±0,00	0,00±0,00	3,09±2,64	0,55±0,70
21 dias		0,00±0,00	0,00±0,00	9,40±5,39	5,07±6,52

Densidade de área (%) dos parâmetros individuais de tecido conjuntivo nos alvéolos dentais de camundongos WT e CCR2KO ao longo dos períodos pós-exodontia

período	grupo	Infiltrado Inflamatório		Vasos Sanguíneos		Fibroblastos		Fibras	
		WT	CCR2KO	WT	CCR2KO	WT	CCR2KO	WT	CCR2KO
0 hora		1,30 ±1,0	0,85±0,62	0,05±0,17	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,87 ±2,98	2,21±2,60
7 dias		1,57±1,49	2,28±1,71	17,73±4,69	16,3±6,33	4,69±1,88	5,89±2,07	31,11±6,42	31,41±9,13
14 dias		0,79±0,73	1,30±1,03	19,22±5,10	27,52±6,10	4,03±1,33	2,94±1,08	24,25±4,86	19,46±3,14
21 dias		0,65±0,45	2,06±1,75	29,71±8,01	21,93±9,46	2,57±1,51	2,55±1,39	12,06±4,22	16,4±409

Densidade de área (%) do Total de Tecido Conjuntivo nos alvéolos dentais de camundongos WT e CCR2KO ao longo dos períodos pós-exodontia

período	grupo	Total de Tecido Conjuntivo (%)	
		WT	CCR2KO
0 hora		3,2±3,08	3,06±2,29
7 dias		55,11±9,21	55,88±7,62
14 dias		45,26±13,56	51,23±6,18
21 dias		44,98±6,21	42,95±7,25

Densidade de área (%) de parâmetros individuais de Tecido Ósseo nos alvéolos dentais de camundongos WT e CCR2KO ao longo dos períodos pós-exodontia

período	grupo	Osteoblastos		Osteoclastos		Matriz óssea	
		WT	CCR2KO	WT	CCR2KO	WT	CCR2KO
0 hora		0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
7 dias		10,64±2,54	8,18±2,43	0,39±0,47	0,21±0,44	27,68 ± 8,27	28,62±5,83
14 dias		9,68±2,26	8,48±3,59	0,95±0,90	2,04±1,51	37,90 ± 4,06	37,64±5,77
21 dias		5,28±1,26	9,79±4,01	0,19±0,25	0,76±0,55	40,14 ± 5,58	41,41±8,24

Densidade de área (%) do total de Tecido Ósseo nos alvéolos dentais de camundongos WT e CCR2KO ao longo dos períodos pós-exodontia

período	grupo	Total de Tecido Ósseo (%)	
		WT	CCR2KO
0 hora		0,00±0,00	0,00±0,00
7 dias		38,71±9,82	37,06±5,72
14 dias		45,49±13,42	48,15±6,18
21 dias		45,62±6,08	51,96±8,02

ANEXO

ANEXO A - Ofício de aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB/USP

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 005/2012

Bauru, 27 de março de 2012.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Papel das células CCR2+ no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos: caracterização histomorfométrica e molecular**, de autoria de Cláudia Cristina Biguetti, sob sua orientação foi enviado ao relator para avaliação e considerado **APROVADO** em reunião desta Comissão realizada no dia 26 de março de 2012.

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

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

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