

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
CENTRO INTEGRADO DE SAÚDE  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PPG- MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

**Fernanda Oliveira de Paula**

**AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE VIMENTINA E DE  
OSTEOPONTINA NO REPARO ÓSSEO PRECOCE DE DEFEITOS  
PREENCHIDOS COM ENXERTO BOVINO ASSOCIADO À TERAPIA  
LASER DE BAIXA INTENSIDADE**

Juiz de Fora

2010

**FERNANDA OLIVEIRA DE PAULA**

**AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE VIMENTINA E DE  
OSTEOPONTINA NO REPARO ÓSSEO PRECOCE DE DEFEITOS  
PREENCHIDOS COM ENXERTO BOVINO ASSOCIADO À TERAPIA  
LASER DE BAIXA INTENSIDADE**

Dissertação apresentada ao PPG-Mestrado em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Clínica Odontológica.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Neuza Maria Souza Picorelli Assis.**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Julião Vieira Aarestrup.**

Juiz de Fora

2010

PAULA, F.O. Avaliação da imunoexpressão de vimentina e de osteopontina no reparo ósseo precoce de defeitos preenchidos com enxerto bovino associado à terapia laser de baixa intensidade. 2010. 96 f. (Curso de Pós-Graduação *stricto sensu* – Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora (MG).

**FERNANDA OLIVEIRA DE PAULA**

**AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE VIMENTINA E DE  
OSTEOPONTINA NO REPARO ÓSSEO PRECOCE DE DEFEITOS  
PREENCHIDOS COM ENXERTO BOVINO ASSOCIADO À TERAPIA  
LASER DE BAIXA INTENSIDADE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

---

Prof<sup>a</sup>. Neuza Maria Souza Picorelli Assis  
Doutora – Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Prof. Rodrigo Guerra de Oliveira  
Doutor – Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde - SUPREMA

---

Prof<sup>a</sup>. Rosangela Almeida Ribeiro  
Doutora – Universidade Federal de Juiz de Fora

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao meu filho Matheus, que com a pureza do seu sorriso e do seu balbuciar “mamãe” me ensinou o sentido pleno do viver.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus por traçar belos caminhos para a minha vida, agregando a ela o privilégio de estar continuamente ladeada por pessoas maravilhosas. Agradeço também a Ele por ter atuado sempre como fonte inspiradora na conclusão de mais esta conquista.*

*À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Neuza Maria Souza Picorelli Assis, pelos conhecimentos transmitidos com tanta competência, entusiasmo, dedicação e compreensão. O teu profissionalismo e a tua amizade te qualificam como exemplo do SER admirável, assim percebido por todos nós.*

*À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Julião Vieira Aarestrup, que com todo o seu empenho mostrou ser possível fazer ciência em nossa realidade.*

*Ao Prof. Dr. Fernando Monteiro Aarestrup, pelo auxílio nas análises deste trabalho.*

*À coordenação do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, na pessoa da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças Afonso Miranda Chaves, pelas oportunidades oferecidas durante este curso de mestrado.*

*Aos meus professores e colegas da turma de Mestrado em Clínica Odontológica da UFJF, com os quais tive a oportunidade de conviver e de muito aprender...*

*Ao meu marido Victorino pelo amor, compreensão, apoio e contribuição ampla e direta na concretização deste projeto. Obrigada por estar sempre ao meu lado com a serenidade, o carinho e o otimismo que lhe são peculiares e que me tornam mais forte. TE AMO...*

*Ao meu filho Matheus, vida da minha vida, que tão cedo aprendeu a estudar... Os momentos ao seu lado são os mais felizes que existem. O seu sorriso, a sua ternura, a sua pureza me impulsionaram com determinação até o fim desta jornada.*

*Aos meus pais, Aloysio e Maria das Graças, pelo amor incondicional, pelo apoio irrestrito e pela máxima dedicação SEMPRE. Vocês são os meus maiores mestres nesta vida... Queira Deus que eu possa ser como vocês...*

*Aos meus irmãos, Aloysio e Priscila, pelo incentivo, pela ajuda e amizade. Vocês são maravilhosos...*

*Ao meu sogro Valdir, aos meus cunhados, cunhadas, tios, primos e amigos, que souberam compreender a minha ausência física.*

*A todas as pessoas que torceram, estimularam e me impulsionaram para mais esta conquista, o meu MUITO OBRIGADA....*

*“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos”*

*Charles Chaplin*

PAULA, F.O. **Avaliação da imunoexpressão de vimentina e de osteopontina no reparo ósseo precoce de defeitos preenchidos com enxerto bovino associado à terapia laser de baixa intensidade.** 2010. 96 f. Dissertação (Curso de Pós-Graduação *stricto sensu* – Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora (MG).

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar, pelo método de imunohistoquímica, a expressão de vimentina e osteopontina durante as fases iniciais de reparo de defeitos ósseos criados em fêmures de ratos *Wistar albinus* tratados com enxerto ósseo bovino orgânico Gen-ox<sup>®</sup> em associação com terapia laser de baixa intensidade. Foram selecionadas de forma aleatória 24 amostras emblocadas de arquivo provenientes de trabalho experimental desenvolvido anteriormente, no qual foram efetuadas análises histológicas e histomorfométricas de fêmures de cinquenta ratos. Obtiveram-se lâminas histológicas dos blocos de diferentes animais, os quais estavam previamente divididos, de acordo com o tratamento realizado, da seguinte forma: grupo I (controle), grupo II (Gen-Ox<sup>®</sup>) e grupo III (LLLT e Gen-Ox<sup>®</sup>). Foram elaboradas quatro lâminas para cada um dos tempos experimentais de 3, 5, 7 e 15 dias para cada grupo. Duas lâminas foram utilizadas para analisar a expressão da osteopontina e duas para vimentina, totalizando 48 lâminas. Em cada lâmina considerou-se dois campos para análise, sendo um campo na região da interface osso-defeito e o outro próximo ao periósteo, em um total de 96 campos. Para realização da reação imunohistoquímica anti-vimentina e anti-osteopontina utilizou-se o método clássico do complexo avidina-biotina peroxidase anti-peroxidase. A marcação positiva foi determinada pela identificação de coloração castanha intracitoplasmática nas reações com ambos os anticorpos. Os cortes foram analisados em microscópio Zeiss em aumentos de 200x, 400x e 1000x, em toda extensão, por dois diferentes observadores. Determinou-se, por método de contagem semiquantitativo, a média de intensidade de células positivas marcadas nos campos dos tratamentos propostos em cada período, o qual foi classificado pelo sistema de escore de acordo com os seguintes parâmetros: 0 = ausência de marcação; + = marcação leve (até 1/3 de células positivas); ++ = marcação moderada (até 2/3 de células positivas); e +++ = marcação intensa (acima de 2/3 de células marcadas). Os resultados mostraram que todos os grupos apresentaram

marcação para vimentina e para osteopontina em todos os períodos do experimento. Observou-se marcação celular mais acentuada para vimentina no período cicatricial inicial no grupo III. Não foram verificadas diferenças na marcação para osteopontina nos animais submetidos à terapia laser de baixa intensidade associada ao enxerto quando comparado aos outros grupos.

**PALAVRAS-CHAVE:** terapia laser de baixa intensidade; imunoistoquímica; enxertos ósseos; vimentina; osteopontina.

PAULA, F.O. **Evaluation of the immunoexpression of vimentin and osteopontin in early bone repair of defects filled with bovine bone graft associated to low level laser therapy.** 2010. 96 f. Dissertação (Curso de Pós-Graduação *stricto sensu* – Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora (MG).

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate, by immunohistochemistry, the expression of vimentin and osteopontin during the early stages of repair of bone defects created in femurs of *Wistar albinus* rats treated with organic bovine bone graft Gen-ox® and associated with low level laser therapy. Twenty four embedded samples were randomly selected from the file of a previous experimental work, in which histological analysis and histomorphometry of the femurs of fifty rats was performed. Histological slides were obtained from blocks of different animals which were divided in accordance to previous treatment as follow: group I (control), group II (Gen-Ox ® ) and group III (LLLT and Gen-Ox ®). Four slides were prepared for each of the experimental time of 3, 5, 7 and 15 days for each group. Of the four slides, two were assessed for the expression of osteopontin and two of vimentin, in a total of 48 slides. On each slide two fields were considered for analysis: one in the bone-defect interface and the other near the periosteum, in a total of 96 fields. To perform the immunohistochemistry anti-vimentin and anti-osteopontin, we used the classical avidin-biotin peroxidase anti-peroxidase method. The positive staining was determined by identification of intracytoplasmic brown color in the reactions with both antibodies. The sections were analyzed in Zeiss microscope at a magnification of 200x, 400x and 1000x by two different observers. The average intensity of positive cells stained in the fields in each period was determined by a semiquantitative counting method which was classified by a scoring system as follow: 0 = no marking; + = mild labeling (up to one third of positive cells); ++ = moderate labeling (up to two thirds of positive cells) and +++ = intense labeling (over two thirds of labeled cells). The results showed that all groups had marked for vimentin and osteopontin in all periods of the experiment. We observed a stronger cell labeling for vimentin in the initial healing period in group III. There were no differences in cell labeling for

osteopontin in animals subjected to low level laser therapy associated with graft as compared to other groups.

KEY WORDS: LLLT; immunohistochemistry; Bone graft; vimentin; osteopontin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sistema óptico Zeiss para captura digital de fotomicrografias	62
Figura 2	Reação imunoistoquímica anti-vimentina. As células positivas exibem coloração acastanhada intracitoplasmática (setas). Dia 3. Grupo I (A). Grupo II (B). Grupo III (C). Aumento original 400x.....	65
Figura 3	Reação imunoistoquímica anti-vimentina. As células positivas exibem coloração acastanhada intracitoplasmática (setas). Dia 5. Grupo I (A). Grupo II (B). Grupo III (C). Aumento original 400x.....	66
Figura 4	Reação imunoistoquímica anti-vimentina. As células positivas exibem coloração acastanhada intracitoplasmática (setas). Dia 7. Grupo I (A). Grupo II (B). Grupo III (C). Aumento original 400x.....	67
Figura 5	Reação imunoistoquímica anti-vimentina. As células positivas exibem coloração acastanhada intracitoplasmática (setas). Dia 15. Grupo I (A). Grupo II (B). Grupo III (C). Aumento original 400x.....	68
Figura 6	Reação imunoistoquímica anti-osteopontina. As células positivas exibem coloração acastanhada intracitoplasmática (setas). Dia 3. Grupo I (A). Grupo II (B). Grupo III (C). Aumento original 400x.....	71
Figura 7	Reação imunoistoquímica anti-osteopontina. As células positivas exibem coloração acastanhada intracitoplasmática (setas). Dia 5. Grupo I (A). Grupo II (B). Grupo III (C). Aumento	

	original 400x.....	72
Figura 8	Reação imunoistoquímica anti-osteopontina. As células positivas exibem coloração acastanhada intracitoplasmática (setas). Dia 7. Grupo I (A). Grupo II (B). Grupo III (C). Aumento original 400x.....	73
Figura 9	Reação imunoistoquímica anti-osteopontina. As células positivas exibem coloração acastanhada intracitoplasmática (setas). Dia 15. Grupo I (A). Grupo II (B). Grupo III (C). Aumento original 400x.....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise semiquantitativa de células com imunorreatividade positiva para vimentina .....	64
Tabela 2	Análise semiquantitativa de células com imunorreatividade positiva para ostopontina.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP	Fosfatase alcalina
ALPase	Reação imunistoquímica da fosfatase alcalina
ATP	Adenosina trifosfato
BMP	Proteína óssea morfogenética
BSP	Sialoproteína óssea
°C	Graus Celsius
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
G	Gramma
GaAlAs	Arseneto de Gálio e Alumínio
GaAs	Arseneto de Gálio
GBR	Regeneração óssea guiada
HA	Hidroxiapatita
HE	Coloração hematoxilina e eosina
HeNe	Hélio Neônio
Hz	Hertz
IGF	Fator de crescimento de insulina
IHC	Coloração imunistoquímica
Ihh	Indian hedgehog

IL	Inteleucina
J	Joule
J/cm <sup>2</sup>	Joule por centímetro quadrado
LLLT	Terapia laser de baixa intensidade
µm	Micrômetro
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mim	Minutos
Mm	Milímetro
mW	Miliwatt
mW/cm <sup>2</sup>	Miliwatt por centímetro quadrado
Nm	Nanômetro
OC	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
PBS	Solução salino-fosfato tamponada
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PECAM	Molécula de adesão de plaquetas da célula endotelial
RANK	Receptor ativador de fator nuclear kB
RANKL	Receptor ativador ligante de fator nuclear kB
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguido da reação em cadeia da polimerase
RUNX	Runt-related transcription

Shh	Sonic hedgehog
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformante $\beta$
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
W	Watt
%	Percentual

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
2.1 TECIDO ÓSSEO E REMODELAÇÃO ÓSSEA.....	21
2.2 ENXERTO ÓSSEO.....	26
2.3 LASERTERAPIA.....	33
2.4 VIMENTINA.....	47
2.5 PROTEÍNAS ÓSSEAS NÃO COLAGENOSAS.....	53
<b>3 PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
4.1 ANÁLISES IMUNOISTOQUÍMICAS.....	60
4.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	62
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
5.1 VIMENTINA.....	63
5.2 OSTEOPONTINA.....	69
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>96</b>