**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

BRUNO ALVARES VISCELLI

Estudo dos efeitos de um anti-inflamatório não esteroideal seletivo para COX-2 na osteogênese e na expressão das proteínas COX-2 e RUNX-2 durante o reparo ósseo alveolar em ratos.

**BAURU
2012**

BRUNO ALVARES VISCELLI

Estudo dos efeitos de um anti-inflamatório não esteroideal seletivo para COX-2 na osteogênese e na expressão das proteínas COX-2 e RUNX-2 durante o reparo ósseo alveolar em ratos.

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Rumio Taga

BAURU

2012

Viscelli, Bruno Alvares
V827e Estudo dos efeitos de um anti-inflamatório não esteroidal seletivo para COX-2 na osteogênese e na expressão das proteínas COX-2 e RUNX-2 durante o reparo ósseo alveolar em ratos. / Bruno Alvares Viscelli. – Bauru, 2012.
p. :137 il. ; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Rumio Taga

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 da FOB-USP
Protocolo número: CEEPA 032/2010
Data: 30 de março de 2010

ERRATA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, aos meus avós e a minha esposa.

A Deus, pelo Seu amor incondicional e por me permitir chegar até aqui. Guiando meus passos em todos os momentos, os mais felizes e principalmente os mais turbulentos, me abençoando com saúde, paz, serenidade e principalmente por me ensinar a amar, perdoar, perseverar e ter fé, dia a dia.

Aos meus avós, Edgar Alvares de Souza (Dêgas) e Almerinda Paim Alvares (Almerindinha), pelo exemplo de vida, pelos ensinamentos, princípios e valores transmitidos e por todo amor, cuidado e carinho. Estarão ao meu lado pra todo o sempre.

A minha esposa, Danielle Santi Ceolin (LINDA), o melhor presente que Deus poderia me enviar. Pela amizade, paciência, pelos conselhos, conversas, pelo incentivo, pelo carinho, por despertar em mim os mais belos sentimentos e principalmente por todos os seus amores (*Ágape, Eros e Philos*). Sempre que precisar, estarei de braços abertos pra te fazer sorrir. Eu te amo.

AGRADECIMENTOS

*"Sou um pouco de todos que conheci,
um pouco dos lugares que fui,
um pouco das saudades que deixei,
sou muito das coisas que gostei.
Entre umas e outras errei,
entre muitas e outras conquistei".*

Ramon Hasman

Ao Prof. Dr. Rumio Taga, meu orientador e amigo, uma pessoa de caráter, extremamente humano, sereno e íntegro. Por todos esses anos de colaboração, dedicação e orientação neste e em outros trabalhos, pela excelente oportunidade dada, pelos ensinamentos, pelos inúmeros CD's gravados, pela paciência e principalmente pela confiança. Obrigado por tudo e principalmente por acreditar em meu potencial.

Aos mestres da Histologia, Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis, Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet, Prof. Dr. Dagoberto S. Filho e Prof^a. Dra. Camila de Oliveira Rodini Pegoraro, por todo conhecimento transmitido, seja nas aulas da graduação, pós-graduação ou nas conversas diárias, por facilitarem a realização deste trabalho através da concessão de materiais e equipamentos, pela oportunidade dada e por contribuírem demais com meu desenvolvimento científico e com meu crescimento pessoal.

Aos professores da FOB-USP, Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues, Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo, Prof. Dr. Flávio Augusto C. de Faria, Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos, Prof^a. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf e Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira, pela contribuição neste trabalho, por abrirem as portas de seus laboratórios e por serem exemplos de professores e profissionais que aprendi a admirar.

As queridas amigas e técnicas do Laboratório de Histologia, Danielle Santi Ceolin, Patrícia M. Germino e Tania Mary Cestari, pela amizade, pelo carinho, pela generosidade, pela ajuda e principalmente pela excelência, profissionalismo e competência que desempenham as tarefas. Meu sincero muito obrigado.

Aos amigos e colaboradores deste trabalho Débora Joana Furlaneto e Ricardo Vinicius Nunes Arantes, pelo profissionalismo, pelo comprometimento e espírito científico. Em especial ao meu amigo, meu querido, Ricardo Arantes, por todo auxílio, pela forma que nos tornamos amigos, por sua amizade, pelas conversas, pelos "títulos conquistados no futebol" e principalmente pela confiança. É sempre bom ter pessoas como você por perto.

Aos que passaram pelo Laboratório de Histologia durante este período e que de certa forma me ajudaram durante esta caminhada. Em especial as funcionárias Aldivina Mendes, Beonildes Teresinha e Teresa AFMS e aos alunos (iniciação científica e pós-graduação), Alexandre S. Garcia, Alex Rafacho, Andréa Spinolla, Bruna B. Bighetti, Bruna Ladeia, Bruno Mufalo, Carlos E. Repeke (Caçuzão), Carolina Francisconi, Caroline Rocha, Elcia V. Silveira, Fábio H. Bogni, Francine Busch, Gabriela Genaro, Isabel C. Meneghetti, Jéssica Paulin, Marcela Claudino, Maria Clara Venturini, Nicole de Mello Carboni, Paula Sanches, Priscila Colavite, Rodrigo N. Ramos, Reinaldo VALÉRIO Germino e Tamiris Vallin por toda amizade, colaboração e principalmente por transformarem momentos difíceis em agradáveis e descontraídos.

A todos os meus companheiros e amigos da pós-graduação, André Shinohara, Bruna S. Centurion, Carina Melo, Daniel V. Dias, Denis Tognolli (Carça), Eduardo B. Belai (Bêla), Eduardo Figueira (Du), Guilherme Cardia (Carioca), Gustavo Tolledo, Heloisa Ap. Barbosa, Hugo A. Vidotti, Julierme F. Rocha (Negão), Lucas Bermejo (Tsé), Otavio Pagin (Tequila), Sandra Matsuda e Thiago Majolo (Bugre) pelos momentos de trabalho, discussões e reflexões e principalmente pelos momentos de descontração e pelas risadas.

A todos os funcionários e professores do Depto. De Educação Física (UNESP-BAURU), por permitirem meu ingresso na pós-graduação e por entenderem e aceitarem minhas ausências para o cumprimento dos créditos e para a realização deste trabalho. Em especial, aos funcionários João M. Rico, Marlene Urquiza, Nelson A. Figueiredo e aos professores Prof. Dr. Cassiano M. Neiva, Prof. Dr. Dalton M. P. Filho, Prof. Dr. Julio W. dos Santos, Profa. Dra. Lilian Ap. Ferreira, Prof. Dr. Márcio P. da Silva, Prof. Dr. Milton V. do Prado Jr., Prof. Dr. Sérgio Tosi Rodrigues, pelos incentivos, conselhos e pela amizade.

Aos professores e amigos, Profª. Dra. Sandra Lia do Amaral e ao Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro, pela contribuição neste trabalho, pelos ensinamentos, por todo auxílio e principalmente por abrir a porta de seus Laboratórios de Fisiologia (LEFEx e LAFIPE, respectivamente) e permitir a realização deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório e amigos Thiago J. Dionísio (Laboratório de Fisiologia e Farmacologia – FOB/USP), André L. Shinohara (Laboratório de Anatomia) pelo profissionalismo, pela amizade, pela prontidão que nos atenderam e por todo auxílio.

A secretária do curso de Biologia Oral, Vera Lucia Rosa Rufino, pela sua eficiência, atenção e disponibilidade apresentada ao curso de pós-graduação e aos alunos.

Aos funcionários do Biotério Central, FOB-USP, Richard, Erasmo, Luis e Elias, pelo excelente tratamento dado aos animais utilizados nesta pesquisa e pelos serviços prestados.

Aos meus pais, Enio Viscelli Junior (Enião), um exemplo de homem, varão valoroso, batalhador, humilde, íntegro, honesto e amigo, e Eliça T. P. Alvares Viscelli (Eliçinha), uma verdadeira guerreira e exemplo de mãe, pelo amor, pela educação, pelas palmadas (que não foram poucas, pois merecia). Agradeço-os, de coração, por me ensinar o caminho que deveria andar e por muitas vezes abrir mão de algumas coisas para sonhar os meus sonhos e fazer de tudo pra que eles se realizassem. Muito obrigado por tudo. Serei eternamente grato por tudo o que fizeram e fazem por mim. Vocês são os grandes responsáveis por esta conquista. Amo vocês demais.

A minha irmã, Livia Alvares Viscelli, pelas lutas passadas e vencidas, pelas discussões, pelas brigas, mas principalmente por sua confiança, amizade e pelo amor eterno e inexplicável que nos une. Te amo muito TOY !

A minha família, a base de tudo, Vó Diva, Vô Enio (*in memoriam*), Tia Tereza, Tia Silvia, Tio Carlos, Vó Dinha, Vô Edgar, Tia Mary, Tio Oscar, Tia Edna, Tio Orlando, Tio "Juquinha", Tio Edi, Tia Fátima, minhas primas e primos, Loraine, Larissa, Aline, Camila, Caio, Murilo, muito obrigado por tudo o que fazem por mim. O lugar de cada um de vocês, no meu coração, está reservado.

A minha segunda família, a Família Ceolin, "Nessa", "Juba", Ricardo, Kaira, em especial ao meus amigos, meu sogro e sogra, Seu Luis e a Dona Maria, por todo carinho, pela amizade, pelo respeito, pelo amor dedicado e recíproco e pela consideração. Vocês são pessoas singulares, especiais e muito importantes em minha vida.

Ao meu sobrinho, João Guilherme (meu príncipe, meu "fião", etc.), pelo sorriso que encanta e quebranta meu coração, pelo amor verdadeiro e incondicional, pela espontaneidade dos seus gestos e atitudes e principalmente, por sua amizade. Sempre que precisar, estarei de braços abertos pra te fazer sorrir. Te amo.

A Faculdade de Odontologia de Bauru, em nome do diretor Prof. Dr. José Carlos Pereira. Sinto-me extremamente honrado de carimbar em meu currículo o nome de uma das Universidades mais conceituadas e renomadas do país, a Faculdade de Odontologia de Bauru, FOB-USP.

Agradeço, de coração, a todos que me auxiliaram neste projeto, participaram desta fase da minha vida e me ajudaram a concretizar este sonho.

Bruno Viscelli

"Cada pessoa que passa em nossa vida é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."

Charles Chaplin

EPÍGRAFE

"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."

(Anatole France)

Ontem um menino que brincava me falou
que hoje é semente do amanhã

Para não ter medo que este tempo vai passar
Não se desespere não, nem pare de sonhar

Nunca se entregue, nasça sempre com as manhãs
Deixe a luz do sol brilhar no céu do seu olhar
Fé na vida, Fé no homem, Fé no que virá

Nós podemos tudo
Nós podemos mais
Vamos lá fazer o que será

(Sementes da Manhã, Gonzaguinha)

RESUMO

Objetivo: No atual trabalho propomo-nos a avaliar morfometricamente possíveis alterações na reparação óssea alveolar pós-exodontia de ratos tratados com Meloxicam, um anti-inflamatório inibidor preferencial da cicloxigenase 2 (COX-2) e correlacionar com a expressão temporal da COX-2 e do fator de transcrição 2 com domínio Runt (Runx-2) associada com a diferenciação de células da linhagem osteoblástica. **Material e Métodos:** A exodontia do incisivo superior direito foi realizada em 120 ratos Wistar, divididos em grupo controle (n = 60) - animais tratados com injeção intraperitoneal de 0,1 ml de solução salina 0,9% diariamente e grupo tratado (n = 60) – animais tratados com injeção de Meloxicam na dose de 3mg/kg de massa corporal, diariamente, ambos durante 7 dias. O volume total do alvéolo (VtA) e do tecido ósseo (VtO), o número de células imunomarcadas/mm² (Nm) para COX-2 e Runx-2 e a expressão protéica por *Western blotting* (WB) da COX-2 e RUNX-2 foram avaliados nos períodos 3, 7, 10, 14, 21 e 30 dias pós-cirurgias. **Resultados:** No grupo tratado o VtA manteve-se constante até os 21 dias, enquanto que no controle foi 0,272 vezes menor em relação aos 3 dias decorrente da maior atividade osteoclástica. Porém, aos 14 dias, no grupo tratado o VtO foi 0,337 vezes menor em relação ao controle decorrente da inibição parcial da transmigração de células inflamatórias responsáveis pela degradação do coágulo e da angiogênese, ocasionando um retardo na formação dos tecidos de granulação/conjuntivo, na diferenciação das células osteoblásticas e na formação/remodelação do tecido ósseo, e consequentemente no reparo ósseo alveolar. A imunomarcção para COX-2 foi observada em diversos tipos celulares, como fibroblastos, células endoteliais, células inflamatórias, osteoblastos e osteócitos. O Nm para COX-2 não apresentou diferenças estatísticas significantes entre os grupos no intervalo de 3 e 21 dias pós-cirurgia, enquanto que, a expressão protéica pelo WB foi em média 0,232 vezes menor no grupo tratado em relação ao controle. Por outro lado, a imunomarcção para Runx-2 foi mais expressiva em osteoblastos e osteócitos e raramente em fibroblastos. O Nm para Runx-2 no grupo tratado durante todo período experimental foi em média 0,256 vezes menor em relação ao controle, sendo o mesmo observado para a expressão protéica pelo WB. **Conclusão:** Dentro dos limites da atual pesquisa, a aplicação do Meloxicam por um curto período de tempo atrasa temporariamente o processo inicial de reparo ósseo alveolar diminuindo a expressão das proteínas COX-2 e RUNX-2.

PALAVRAS-CHAVE: alvéolo dental; anti-inflamatórios; inibidores da cicloxigenase-2; runx-2

ABSTRACT

Objective: To evaluate morphometrically possible changes in post-extraction alveolar bone healing in rats treated with Meloxicam, a selective anti-inflammatory inhibitor of cyclooxygenase (COX-2) and to correlate it with the temporal expression of COX-2 and transcription factor 2 with Runt domain (Runx-2) associated with differentiation of osteoblastic lineage cells. **Material and Methods:** The extraction of the right upper incisor was made in 120 male Wistar rats, divided into control group (n=60) - animals treated with an intraperitoneal injection of 0,1 ml of 0,9% NaCl solution daily for 7 days and the treated group (n=60) - animals treated with injection of 3mg/kg of body weight of Meloxicam 0.9% NaCl solution daily for 7 days. The total alveolar volume (VtA), total bone tissue volume (VtO), number of immunohistochemically positive cells/mm² (Nm) for COX-2 and RUNX-2 and the *Western blotting*(WB) COX-2 and RUNX-2 protein expressions were evaluated after 3, 7, 10, 14, 21 and 30 days after the surgeries. **Results:** In the treated group the VtA remained constant until the 21st day, while in the control group at the same day the value was 0,272 times lower compared to the 3 days period, due to the higher osteoclastic activity. However, at 14 days the VtO was 0,337 times lower in the treated group compared to the control due to the partial inhibition of the transmigration of inflammatory cells responsible for the degradation of the clot and angiogenesis, causing a delay in the formation of granulation/connective tissues, differentiation of osteoblastic cells and in bone tissue formation/remodeling, and consequently in the alveolar bone repair. The immunostaining for COX-2 was observed in various cell types, such as fibroblasts, endothelial cells, inflammatory cells, osteoblasts and osteocytes. The Nm for COX-2 showed no statistical differences between groups from the 3rd to the 21st day, while the WB protein expression was on average 0,232 times lower in the treated group compared to the control. On the other hand, the immunostaining for Runx-2 was more expressive in osteoblasts and osteocytes and rarely in fibroblasts. The Nm for Runx-2 on the treated group was, during the whole experimental period, on average 0,256 times smaller than in the control. The same difference was observed in the protein expression by WB. **Conclusion:** Within the limits of the present study, it was concluded that the application of Meloxicam daily for 7 days causes a temporary delay in the alveolar bone repair decreasing the expression of proteins COX-2 and RUNX-2.

KEYWORDS: tooth socket. anti-inflammatory; cyclooxygenases-2 inhibitors; runx-2

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Área total analisada
a	Área do alvéolo
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
BMP-2	Proteína morfogenética óssea tipo 2
C1	Animal 1 – grupo controle
C2	Animal 2 – grupo controle
C3	Animal 3 – grupo controle
C4	Animal 4 – grupo controle
C5	Animal 5 – grupo controle
CA	Califórnia
CEEPA	Comissão de Ética no Ensino de Pesquisa em Animais
cm	Unidade de medida - Centímetros
Co	Coágulo sanguíneo
COX	Cicloxigenases
COX-1	Cicloxigenase 1
COX-2	Cicloxigenase 2
COX-3	Cicloxigenase 3
CTRL	Grupo Controle
d	Distância macroscópica entre secções
DAB	3,3-Diaminobenzidina tetrahidrocloreto
dp	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EP-1	Receptor de prostaglandina 1
EP-2	Receptor de prostaglandina 2
EP-3	Receptor de prostaglandina 3
EP-4	Receptor de prostaglandina 4
EUA	Estados Unidos da América
FGF-β	Fator de Crescimento Fibroblástico
Fig	Figura
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
g	Unidade de medida - Gramas

GPCR	Receptores ligados a proteína G
h	Hora
HE	Hematoxilina – Eosina
HRP	Horseradish peroxidase
i	Uma estrutura do alvéolo
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
k	Distância entre as secções histológicas
K0	Knockout
Kda	Quilodaltons
Kg	Unidade de medida - Quilograma
LPS	Lipopolissacarídeo
Ltda	Limitada
M	Unidade de medida – Molar
M	Média
M-CSF	Fator de estimulação de colônia de macrófago
mg	Unidade de medida - Miligramas
min	Minutos
mL	Unidade de medida - Mililitros
mM	Unidade de medida - Milimolar
mm²	Unidade de medida de área - Milímetros quadrados
mm³	Unidade de medida de volume - Milímetros cúbicos
MSC	Células-tronco mesenquimais
NaCl	Cloreto de sódio
NFDM	Non-fat dry milk
Nm	Número de células imunomarcadas
nM	Unidade de medida - Nanomolar
nº	Número
NY	Nova Iorque – Estados Unidos
OPG	Osteoprotegerina
P	Número de pontos sobre o alvéolo
PBS	Solução fosfato tamponada
PG	Prostaglandinas
PGE2	Prostaglandina E2

PGF	Prostaglandina F
pH	Potencial hidrogeniônico
pi	Número de pontos sobre uma estrutura i
PIS	Solução de isolamento de proteínas
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoreto
PTH	Paratormônio
RANKL	Ligante RANK
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RUNX-2/cbfa1	Fator de transcrição 2 com domínio Runt
S.A.	Sociedade Anônima
Σa	Somatória das áreas
T1	Animal 1 - grupo tratado
T2	Animal 2 - grupo tratado
T3	Animal 3 - grupo tratado
T4	Animal 4 - grupo tratado
T5	Animal 5 - grupo tratado
TBS	Solução tamponada por Tris
Tc	Tecido conjuntivo
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
TO	Tecido ósseo
Trat	Grupo tratado
USA	United States of America
USP	Universidade de São Paulo
V	Unidade de medida - Voltagem
V_{ref}	Volume de referência ou volume total do alvéolo
VS	Vasos sanguíneos
V_{ti}	Volume total de uma estrutura i
V_{vi}	Densidade de volume ou fração de volume de uma estrutura i
WB	Western blotting
WT	Wild-type
α	Letra grega – alpha
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μg	Micrograma

μL	Unidade de medida - Microlitro
μm	Unidade de medida - Micrômetro
3D	Três dimensões

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	PROPOSIÇÃO	25
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	ANIMAIS E CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO	31
3.2	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	32
3.3	TRATAMENTO PÓS-OPERATÓRIO	34
3.4	COLETA DO MATERIAL	34
3.5	PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS GERAIS	35
3.6	ANÁLISE MORFOLÓGICA DO PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR	35
3.7	ANÁLISE MORFOMÉTRICA	35
3.7.1	Determinação do volume total do alvéolo ($V_{(ref)}$) e do volume total (V_{ti}) do tecido ósseo.....	35
3.7.2	Avaliação da densidade de volume (V_{vi}) e do volume total (V_{ti}) do tecido ósseo	38
3.8	PROCEDIMENTOS PARA A ANÁLISE DA COX-2 E DO RUNX-2 POR MÉTODOS IMUNOISTOQUÍMICOS	39
3.8.1	Contagem do número de células imunomarcadas por mm^2 de tecido	40
3.9	PROCEDIMENTO PARA A ANÁLISE DA COX-2 E DO RUNX-2 POR WESTERN BLOTTING	41
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4	RESULTADOS	45
4.1	RESULTADOS PONDERAIS	47
4.2	VOLUME TOTAL DO ALVÉOLO	48
4.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS CORTES HISTOLÓGICOS CORADOS PELA TÉCNICA DE HE	51
4.4	DENSIDADE DE VOLUME DE TECIDO ÓSSEO.....	61
4.5	VOLUME TOTAL DE TECIDO ÓSSEO (mm^3)	63
4.6	IMUNOMARCAÇÃO PARA COX-2	65
4.7	NÚMERO DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS PARA COX-2/ mm^2	79
4.8	IMUNOMARCAÇÃO PARA RUNX-2	81

4.9	NÚMERO DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS PARA RUNX-2/mm ²	95
4.10	DENSITOMETRIA DA ANÁLISE PROTÉICA POR WESTERN BLOTTING PARA A COX-2	97
4.11	DENSITOMETRIA DA ANÁLISE PROTÉICA POR WESTERN BLOTTING PARA O RUNX-2	100
5	DISCUSSÃO	107
6	CONCLUSÃO	119
	REFERÊNCIAS	123
	ANEXOS	135

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, estudos visando compreender e conhecer os principais fatores que atuam no processo de reparação óssea tem ganhado grande destaque. Assim, hoje sabemos que este processo pode ser influenciado por inúmeras variáveis, e ainda que está sob controle de vários hormônios e citocinas atuando sinérgica ou antagonicamente entre si em concentrações, tempo e sequências ideais, no sentido de garantir uma função celular adequada para a formação e/ou remodelação óssea.

Por outro lado, após um procedimento cirúrgico, especialmente aquele envolvendo o tecido ósseo, o processo inflamatório inicial no local pode tornar-se desconfortável para o paciente devido à geração de edema e dor. Nesse caso, com a intenção de minimizar esses sintomas, é indicado ao paciente o uso pós-operatório de anti-inflamatórios.

Esses anti-inflamatórios podem ser de dois tipos, os “esteroidais” e os “não-esteroidais”. Os esteroidais ou corticosteróides possuem uma ação anti-inflamatória maior que os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) por bloquearem a enzima fosfolipase A2, reduzindo, deste modo, não só a liberação de prostaglandinas (PGs), mas também de outros metabólitos e mediadores químicos, tais como tromboxanas e leucotrienos (SEYMOUR & HEASMAN, 1988). Os AINES, por sua vez, agem bloqueando a via das cicloxigenases (COX), produzindo efeitos no metabolismo do ácido araquidônico e ocasionando a inibição da síntese de PGs (EMERY, 1996; SALVI *et al.*, 1997), além de possuírem ainda ação analgésica e antipirética (SEYMOUR & HEASMAN, 1988).

A COX representa a enzima limitante na produção das PGs, que são membros da família dos eicosanóides e produzidas por quase todas as células do corpo que participam ativamente de diversos processos metabólicos, fisiológicos e patológicos. Atualmente, são conhecidas três isoformas da COX, a COX-1, COX-2 e COX-3 (BOTTING, R., 2003; CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002; CLARIA, J., 2003; CROFFORD, L.J., 1997; FLEISCHMANN *et al.*, 2002; HLA *et al.*, 1999; O'BANION, MK., 1999; VANE, *et al.*, 1998; O'NEIL E FORD-HUTCHINSON, 1993). Muitos dos efeitos constitutivos de manutenção homeostática da COX, como agregação

plaquetária, manutenção da função renal, citoproteção gastrointestinal entre outros, são mediados pela COX-1, enquanto muitos dos efeitos na inflamação e na indução são mediados pela COX-2 (CROFFORD, LJ., 1997; CURTIS, EK., 2005, DUBOIS *et al.*, 1998; HLA *et al.*, 1999; MIYAUCHI *et al.*, 2004; VANE, JR. *et al.*, 1998). O uso prolongado de AINES não seletivos, que inibem a COX-2, mas também consideravelmente a enzima COX-1, pode trazer consequências prejudiciais para a integridade do organismo (VANE, JR. *et al.*, 1998), provocando desconforto abdominal, náuseas, vômitos, dispepsias, úlceras e hemorragia gastrintestinal, insuficiência renal e disfunção plaquetária (MATTIA e COLUZZI, 2005; MIYAUCHI *et al.*, 2004; VANE, JR. *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2003). Além disso, diante de um quadro inflamatório, a isoforma COX-1 praticamente não se altera ou apresenta um aumento discreto na sua expressão. Já, a isoforma COX-2 que é constitutivamente expressa em pequena quantidade no cérebro, intestino, rins, testículos, endotélio vascular, glândula tireóide e pâncreas (BEEJAY e WOLFE, 1999), diante de quadro inflamatório, aumenta exacerbadamente sua expressão (CROFFORD, 1997; SCHONBECK *et al.*, 1999).

À partir da década de 90, com intuito de minimizar esses efeitos colaterais indesejáveis, drogas anti-inflamatórias não esteroidais com a finalidade de bloquear preferencialmente a enzima COX-2 foram lançadas no mercado, conferindo maior segurança na utilização dos AINES, principalmente no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, quando as mesmas são utilizadas por longos períodos (GIERSE *et al.*, 1995).

Nesse contexto, o Meloxicam é um anti-inflamatório não esteroidal, pertencente à classe do ácido enólico, um dos derivados das oxicanas, que atua preferencialmente inibindo a enzima COX-2 (NOBLE & BALFOUR, 1996), apresentando favorável tolerabilidade gastrointestinal e renal, preservando o organismo de reações adversas ligadas à excessiva inibição da COX-1 (MASFERRER *et al.*, 1994, ENGELHARDT *et al.*, 1995; NOBLE & BALFOUR, 1996; DEQUEKER *et al.*, 1998). Atualmente, já existem AINES, tais como o Celecoxibe, Parecoxibe, Valdecoxibe, Rofecoxibe e Eterocoxibe, que inibem quase que estritamente apenas a enzima COX-2, sendo denominados de inibidores específicos da COX-2 (PENNING *et al.*, 1997; CHAN *et al.*, 1998; TALLEY *et al.*, 2000; RIENDEAU *et al.*, 1997).

A COX-2 não desempenha papel apenas na resposta inflamatória, mas tem também importante participação na atividade fisiológica de muitos tecidos e órgãos sendo expressa constitutivamente nos rins, no pâncreas e no cérebro (CROFFORD, 1997), exercendo ainda influência na ovulação, na síntese de osso lamelar, nas atividades dos osteoblastos e osteoclastos, na manutenção do tônus vascular nos pulmões e na regulação da função endotelial e plaquetária.

Deste modo, alguns dos AINES seletivos para COX-2 mostraram-se prejudiciais a função renal e a hemostasia sanguínea, oferecendo maior risco de trombose e infarto aos pacientes (MELNIKOVA, 2005), sendo que alguns foram retirados do mercado pela ANVISA e outros restritos ao tratamento de osteoartrite, dismenorréia primária, reumatismo, gota, artrite, dor articular e em pós-operatórios, sendo a compra permitida apenas com apresentação do receituário C1-Branco.

Os mecanismos descrevendo como os AINES inibidores seletivos da COX-2 prejudicam a reparação óssea ainda não foram completamente elucidados, mas há evidências de que a enzima COX-2, via produção das PGs, tem importante papel na diferenciação dos osteoblastos, participando ativamente do processo osteogênico (FORWOOD, MR., 1996; SATO *et al.*, 1997; ARIKAWA *et al.*, 2004) e também na diferenciação dos osteoclastos (SATO *et al.*, 1997). Essa ambiguidade é similar ao que ocorre com o paratormônio (PTH), onde a contínua administração de PGE2 em ratos pode levar a perda óssea, contudo, a administração intermitente tem efeito anabólico (TIAN *et al.*, 2007).

A administração de PGs em ratos, cães e humanos, induz o aumento da massa óssea cortical e medular (UEDA *et al.*, 1980; NORRDIN E SHIH, 1988; FAYE-PETERSEN, *et al.*, 1996) enquanto estudos *in vitro* têm mostrado que principalmente a PGE2 exógena estimula a diferenciação osteoblástica tanto em cultura de células estromais da medula óssea quanto em cultura de precursores de osteoblastos obtidos a partir da calvária de ratos (FLANAGAN E CHAMBERS, 1992; NAGATA *et al.*, 1994; SCUTT E BERTRAM, 1995; KANEKI *et al.*, 1999). Convém salientar, que concordando com os resultados acima descritos, ocorre redução na diferenciação osteoblástica em cultura de células estromais da medula óssea obtidas de camundongos knockout (KO) para COX-2 em relação aos *wild-type* (WT) (OKADA *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2002).

As PGE2 atuam interagindo com os membros da subfamília dos receptores ligados a proteína G (GPCRs), denominados de EP1, EP2, EP3 e EP4 (KOBAYASHI *et al.*, 2005). Conforme o tipo de receptor e a subsequente via de ativação intracelular e sua interação com outras vias, diferentes respostas celulares podem ser desencadeadas (BLACKWELL *et al.*, 2010), desta forma, os receptores EP2 e EP4 têm sido relacionados com os efeitos anabólicos da PGE2 no tecido ósseo (LI *et al.*, 2002; AKHTER *et al.*, 2001; MINAMIZAKI *et al.*, 2009). A PGE2 ativa o receptor EP4 que leva a expressão da BMP-2, um importante regulador do processo de reparo ósseo. Em cultura de células-tronco mesenquimais (ARIKAWA *et al.*, 2004) a BMP-2 estimula a formação óssea e ainda proporciona um aumento da formação de osso lamelar em ratos (FORWOOD, MR., 1996, MONTJOVENT *et al.*, 2004). Por outro lado, a transcrição da BMP-2 induz a expressão de COX-2 nos osteoblastos, via ligação com o fator de transcrição RUNX-2/Cbfa1, e a indução da COX-2 contribui para o efeito da BMP-2 sobre a diferenciação osteoblástica e a formação de osteoclastos (CHIZAKU *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2002; THIES *et al.*, 1992). Estes resultados estão de acordo com estudos *in vitro* utilizando células da calvária de camundongos K0 para COX-2 versus WT, que mostraram redução nos níveis de RUNX-2 e osterix, que é restaurada com administração exógena de PGE2 (ZHANG *et al.*, 2002), sendo que, a PGE2 reduz a proliferação osteoblástica, provavelmente para sua diferenciação terminal, porém aumenta a população de células precursoras (TAI *et al.*, 1997; XU *et al.*, 2007). Estudos *in vivo* têm demonstrado falhas na diferenciação final dos osteoblastos com redução da expressão de RNAm para *c-fos* e osteocalcina durante o processo de reparo ósseo com uso de AINES seletivos para COX-2 .

Devido à ampla utilização de anti-inflamatórios no pós-operatório de cirurgias odontológicas e ortopédicas, a interferência dos AINES seletivos para COX-2 no processo de reparo ósseo tem sido amplamente avaliada, mas com resultados muito discordantes (O'CONNOR *et al.*, 2009; DIMMEN *et al.*, 2009; MATSUMOTO *et al.*, 2008; MURNAGHAN *et al.*, 2006; AKRITPOULOS *et al.*, 2009; DIMMEN *et al.*, 2008; KARACHALIOS *et al.*, 2007; SIMON E O'CONNOR, 2007; LEONELLI *et al.*, 2006; GERSTENFELD *et al.*, 2003; GOODMAN *et al.*, 2002; 2005). Segundo FRACON (2008) isto ocorre em decorrência de variações metodológicas como a dosagem, tempo de tratamento, variações na sensibilidade intra e interespecies, fatores locais e sistêmicos compensatórios, grau de remodelação óssea e

farmacocinética da droga como citados por vários autores (BOURSINOS *et al.*, 2009; VUOLTEENAHONEN *et al.*, 2008; O'CONNOR E LYSZ, 2008; HARDER e AN, 2003; SALARI E ABDOLLAHI, 2009; RADI e KHAN, 2005; MULLIS *et al.*, 2006); existindo a necessidade em modelos animais, de mais informações relacionadas às dosagens farmacocinéticas comparativas com as terapias utilizadas em humanos, além de uma revisão no seu uso em dose alta por um longo período de tempo, considerando que clinicamente, na odontologia, o uso mais frequente se dá no controle da dor aguda pós-operatória (GERSTENFELD *et al.*, 2003; MULLIS *et al.*, 2006).

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Com o objetivo de avaliar a interferência do uso, por um curto período de tempo, de um anti-inflamatório não esteroideal seletivo para COX-2 no processo de reparação óssea, propomo-nos a avaliar em alvéolos de ratos tratados ou não com o Meloxicam nos períodos experimentais de 3, 7, 10, 14, 21 e 30 dias após extração do incisivo superior direito:

- morfologicamente, a reabsorção do coágulo sanguíneo, a invasão vascular e celular do tecido de granulação; diferenciação das células ósseas; e caracterizar espacial e temporalmente a formação e remodelação óssea;
- morfometricamente, o volume do alvéolo e a quantidade e velocidade de formação de tecido ósseo no alvéolo;
- imunoistoquimicamente, a expressão das proteínas COX-2 (ciclooxigenase 2) e RUNX-2 (fator de transcrição 2 com domínio Runt), essa última associada com a diferenciação de células da linhagem osteoblástica, e a quantidade e tipos celulares expressando essas proteínas;
- e pela técnica do *Western blotting*, a expressão protéica total da COX-2 e do RUNX-2 durante a reparação alveolar.

De posse desses dados pretende-se verificar a ocorrência de possíveis alterações morfológicas e morfométricas na formação óssea durante o reparo alveolar provocadas pelo tratamento com Meloxicam, correlacionando-as com a expressão temporal das proteínas COX-2 e do RUNX-2, essa última como marcadora de diferenciação da população de células da linhagem osteoblástica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO

Na presente pesquisa foram utilizados 120 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, com 60 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP), subdivididos conforme o cronograma apresentado na Figura abaixo:

Figura 1 - Cronograma de utilização dos animais

Os ratos foram alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor-Anderson & Clayton S.A) e água *ad libitum*, exceto nas primeiras 24 horas pós-exodontia, em que essa ração era triturada. Os animais foram acondicionados em caixas individuais descontaminadas com detergente enzimático (Detergerm Enzimático Johnson Diversey), desinfetadas por fricção de álcool 70% por 3 vezes, e forradas com maravalha estéril. Além disso, todos os animais foram mantidos em um ambiente controlado com ciclo claro/escuro de 12 horas, sob umidade e temperatura constantes.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (FOB/USP) no dia 30 de março de 2010, processo CEEPA nº 032/2010 (Anexo A) e no dia 04 de Maio de 2010 foi aprovado o uso de mais 80 animais (Anexo B) para substituírem os que foram perdidos durante os procedimentos cirúrgicos devido a permanência de parte da raiz do incisivo no interior do alvéolo.

3.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de Ketamina (Dopalen®, AgriBrands Ltda) e Xilazina (Anasedan®, AgriBrands Ltda), na dosagem de 100mg/kg de massa corporal, respectivamente, e o incisivo central direito de cada rato (Figura 2a) foi extraído segundo as indicações de OKAMOTO; RUSSO (1973), com instrumentais cirúrgicos adaptados para esse fim.

Inicialmente, foi feita a sindesmotomia ao redor da região cervical do dente seguida de sua luxação lateral (Figura 2b-d), tomando-se cuidado para a não ocorrência de fratura da sua raiz ou da tábua óssea externa, até a exodontia propriamente dita (Figura 2e-f), tomando o cuidado sempre da manutenção da integridade da crista óssea (Figura 2g). Após a extração do incisivo, a sutura da região foi realizada com fio de sutura Vicryl 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, Brasil).

Cada animal foi mantido em gaiola individual durante todo o período experimental no Biotério Central da FOB-USP.

Figura 2 - Procedimentos cirúrgicos de extração dentária: **a)** visão da cavidade bucal mostrando o incisivo superior (seta) a ser extraído; **b)** dissecção da mucosa gengival; **c)** deslocamento do incisivo da respectiva crista alveolar; **d)** luxação do dente com auxílio de um porta agulha; **e)** extração do incisivo através de movimento circular de vestibular para a lingual; **f)** incisivo já extraído (seta) e a abertura da cavidade alveolar após a extração; e **g)** integridade da crista do osso alveolar (seta)

3.3 TRATAMENTO PÓS-OPERATÓRIO

Grupo controle: ratos tratados com injeção por via intraperitoneal de 0,1 ml de solução de NaCl 0.9% em dose única diária, durante 7 dias.

Grupo tratado: ratos tratados com injeção por via intraperitoneal de 3mg/kg de massa corporal do anti-inflamatório Meloxicam, diluído em solução de NaCl 0.9%, em dose única diária, durante 7 dias. A concentração do Meloxicam utilizada foi de 3mg/mL (BEZERRA *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

3.4 COLETA DO MATERIAL

Após os períodos experimentais de 3, 7, 10, 14, 21 e 30 dias os ratos foram mortos por dose excessiva de anestésico e a maxila direita de cada animal foi imediatamente separada da esquerda com um bisturi contendo lâmina nº 15 junto ao plano sagital mediano, acompanhando a sutura intermaxilar. Com auxílio de uma tesoura reta realizou-se um corte tangencial a face distal do último molar, obtendo-se assim a peça histológica com alvéolo do incisivo superior direito inteiro. As hemimaxilas foram processadas de acordo com o tipo de análise a ser realizada:

- a) **Análise histológica e imunoistoquímica:** a hemimaxila foi fixada em solução de formol a 10% em tampão fosfato pH 7,2 por 24 horas e subsequentemente, submetidas ao processamento histológico.
 - b) **Análise protéica:** a região do alvéolo do dente incisivo superior direito foi cuidadosamente dissecada com auxílio de lâminas de bisturi e tesoura removendo todo o excesso de tecido ao redor do alvéolo. Em seguida, a peça foi armazenada em tubos para microcentrifuga (Eppendorf protein LoBind microcentrifuge tubes - Eppendorf® AG, Hamburg, Germany) de 2mL e congelada a temperatura de -80°C.
-

3.5 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS GERAIS

Após o período de fixação, as peças foram desmineralizadas em solução de EDTA (4,13% de Tritriplex III Merck® e 0,44% de hidróxido de sódio) a temperatura ambiente, por um período de aproximadamente 30 dias. A seguir, as peças foram processadas histologicamente para inclusão em Histosec® (resina sintética + parafina), (Merck, Alemanha) e cortes transversais semi-seriados de 5 µm de espessura de cada alvéolo, foram obtidos. Os cortes histológicos foram coletados em lâminas de vidro comuns e coradas pela Hematoxilina e Eosina (HE), e em lâminas silanizadas para as imunomarcações.

3.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR

Os cortes histológicos corados pela HE foram analisados no microscópio Axioscope 2 (Zeiss®) procurando-se observar os seguintes eventos: a) reabsorção do coágulo sanguíneo; b) presença do tecido de granulação; c) formação de tecido conjuntivo, ósseo e medular; d) remodelação óssea com a presença de osteoclastos; e e) o grau de maturação do tecido ósseo neoformado.

3.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

3.7.1 Determinação do volume total do alvéolo ($V_{(ref)}$) pelo método de Cavalieri nos cortes semi-seriados corados pela HE

Para a determinação do volume do alvéolo, o mesmo foi reconstruído em três dimensões (**3D**) segundo o método de Cavalieri (1635 apud HOWARD e REED, 1998). Segundo o matemático Bonaventura Cavalieri, o volume de referência de qualquer objeto ($V_{(ref)}$) pode ser estimado através de uma exaustiva série de secções paralelas por uma distância conhecida. A estimativa se dá pela distância entre as secções (d ou k , sendo d a nomenclatura utilizada para cortes macroscópicos e k

para cortes microscópicos) multiplicadas pela somatória das áreas (Σa) de cada secção, então: $V_{(ref)} = k \times \Sigma a$. Essas avaliações contaram com auxílio da bolsista de iniciação científica do Laboratório de Histologia (FOB-USP), Débora Joana Furlaneto com projeto aprovado na FAPESP (Proc.nº 2010/20747-5).

Durante o procedimento de inclusão em Histosec as peças contendo o alvéolo dental foram orientadas para a obtenção de cortes transversais. Para a padronização da distância entre os cortes semi-seriados foi realizado um projeto piloto utilizando dois alvéolos, um obtido aos 3 dias pós-cirúrgico (alvéolo intacto) e o outro após 30 dias (alvéolo com acentuada redução). Cortes transversais seriados de 5 µm de espessura foram obtidos de todo o alvéolo (Fig. 3) e corados pela HE. A área (a) de todos os cortes seriados foi determinada em um sistema de análise digital KS300 (Carl Zeiss) (Fig. 4).

Figura 3 - Esquema do alvéolo de rato obtido aos 3 e 30 dias pós-cirurgia mostrando que aos 30 dias ocorre uma acentuada redução da região coronal e menor na apical, reduzindo o número total de cortes seriados.

Figura 4 - Esquema do número de lâminas contendo os cortes transversais dos alvéolos e a medida da área do alvéolo em cada corte tecidual no sistema KS300.

O volume médio do alvéolo ($V_{(ref)}$) obtido em cortes sequenciais de $5\mu m$ e alternado a cada 25 cortes ($125\mu m$), 50 cortes ($250\mu m$) e 100 cortes ($500\mu m$) está apresentado na tabela abaixo. A espessura máxima entre os cortes dentro de um erro aceitável de 5% foi de $250\mu m$ (Tabela 1 e Fig. 5)

Tabela 1 - Volume médio (mm^3) do alvéolo ($V_{(ref)}$) obtido nos cortes sequenciais e alternados para cada espessura (k).

Alvéolo	$V_{(ref)}$ dos Cortes sequenciais ($k = 5\mu m$)	$V_{(ref)}$ dos Cortes alternados ($k = 125\mu m$)	$V_{(ref)}$ dos Cortes alternados ($k = 250\mu m$)	$V_{(ref)}$ dos Cortes alternados ($k = 500\mu m$)
3 dias (mm^3)	23,174	23,163	22,907	22,414
Erro (%)		0,0475	1,1527	3,3177
30 dias (mm^3)	15,602	16,352	16,282	16,769
Erro (%)		4,8327	4,1575	7,1674

Figura 5 - Esquema do alvéolo de rato obtido aos 3 e 30 dias pós-operatório mostrando os cortes a serem avaliados segundo o método de Cavalieri para o cálculo do volume total do alvéolo.

3.7.2 Avaliação da densidade de volume (V_{vi}) e do volume total (V_{ti}) do tecido ósseo

A densidade de volume (V_{vi}) ou fração de volume do todo (alvéolo) ocupada por um determinado constituinte(i) do todo (tecido ósseo e tecido medular) foi avaliada em um microscópio Olympus BX 50 (Olympus®, Japão) com uma objetiva de imersão de 100X e uma ocular Zeiss Kpl 8x contendo um graticulo de integração II Zeiss® (Figura 6), composta de 10 linhas paralelas e de 100 pontos numa área quadrangular. Foram analisados 4 cortes histológicos de cada terço (apical, médio e coronal) e de cada corte foram selecionados 15 campos histológicos por um esquema de amostragem sistemática (WEIBEL, 1969), totalizando 180 campos para cada alvéolo. A imagem do graticulo foi superposta, sucessivamente, a esses 180 campos histológicos (Figura 5) e os seguintes dados foram anotados: a) número de pontos (p_i) que caíram sobre o tecido ósseo (i) e sobre o alvéolo inteiro (P). A

densidade de volume de tecido ósseo (V_{vi}) foi calculada segundo a relação: $V_{vi} = \pi i/P$ (WEIBEL, 1969). Tendo esses dados e conhecendo-se previamente, o volume do alvéolo (V_{ref}), calculou-se volume total tecido ósseo (V_{ti}), $V_{ti} = V_{vi} \times V_{ref}$.

Figura 6 - Graticulo de integração II Zeiss® sobre a imagem de um campo histológico

3.8 PROCEDIMENTOS PARA A ANÁLISE DA COX-2 E DO RUNX-2 POR MÉTODOS IMUNOISTOQUÍMICOS

Foram utilizados os seguintes anticorpos:

- a) COX-2:** anti-COX-2 (*rabbit polyclonal*): código #4842 (Cell Signaling Technology®, CA, USA) um dos principais mediadores das prostaglandinas e do ácido araquidônico.
- b) RUNX-2:** anti-RUNX-2 (*rabbit polyclonal*): código ab23981 (Abcam®, MA, USA), detectado em precursores de osteoblastos e principalmente nos osteoblastos.

Para as imunomarcações o seguinte protocolo foi usado: a) cortes de 4µm obtidos em lâminas silanizadas (cola a base de poli-D-lisina) foram colocados na estufa a 60°C por 40 minutos para o início da desparafinização e adesão na lâmina; b) em seguida, as lâminas foram acomodadas em berços de polietileno com ranhuras, onde passaram por três banhos de xilol por 10 minutos, dois banhos de etanol absoluto por 10 minutos e um banho de álcool 70% de 5 minutos. Por último, as lâminas foram lavadas e deixadas em dois banhos de PBS (solução fosfato tamponada, pH 7,4) por 5 minutos; c) subsequentemente, foi realizada a inativação da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% por 15 minutos; d) após a lavagem em PBS foi realizada a recuperação dos epítomos por ação da enzima pepsina (código S3002 – Dakocytomation® Carpinteria, CA, USA) por 20 minutos; e) os cortes foram lavados em PBS e foi realizado o bloqueio das proteínas sorológicas com solução de leite em pó Molico® 7% (Nestlé Brasil Ltda, Araçatuba, São Paulo, Brasil) por 15 min; f) o excesso da solução bloqueadora foi aspirado e os cortes foram incubados com os anticorpos primários específicos para COX-2 e RUNX-2 diluídos em: 1:250 e 1:170, respectivamente, em diluidor de anticorpo (código ADS-125, Spring Bioscience Corporation, CA, USA) por 1 hora em câmara úmida e temperatura ambiente. Para controle negativo, um dos cortes foi incubado somente com o diluidor; g) os cortes foram lavados com PBS e incubados no N-Histofine – Simple stain Rat MAX PO (Multi) (Universal Immuno-peroxidase Polymer for rat tissue anti-mouse and rabbit – *NICHIREI BIOSCIENCES INC.*) por 30 minutos à temperatura ambiente; h) os cortes foram lavados e expostos a solução do DAB (solução líquida de 3,3'-diaminobenzidine, Dakocytomation Carpinteria, CA, USA) por 2-3 minutos e contra corados por Hematoxilina de Harris por 1 minuto.

3.8.1 Contagem do número de células imunomarcadas por mm² de tecido

O número de células marcadas/mm² de tecido foi determinado em um sistema de análise de imagem Kontron KS300 (Kontron Electronic GMBH). Foram analisados 3 cortes teciduais de cada terço (apical, médio e coronal) de cada alvéolo. Em cada corte foram capturadas 15 imagens de campos histológicos

selecionadas por amostragem sistemática (WEIBEL, 1969), sendo no total 135 imagens para cada alvéolo. Para cada imagem obtida, foi avaliado o número de células marcadas (Nm) e a área total analisada (A). Conhecendo-se a área total analisada e obtendo-se o número total de células imunomarcadas, determinamos o índice de marcação por mm².

3.9 PROCEDIMENTO PARA A ANÁLISE DA COX-2 E DO RUNX-2 POR WESTERN BLOTTING

Foram utilizados os seguintes anticorpos:

- a) **COX-2:** anti-COX-2 (*rabbit polyclonal*): código #4842 (Cell Signaling Technology®, CA, USA) um dos principais mediadores das prostaglandinas e do ácido araquidônico, exibindo peso molecular de 74KDa.
- b) **RUNX-2:** anti-RUNX-2 (*rabbit polyclonal*): código ab23981 (Abcam®, MA, USA), detectado em precursores de osteoblastos e principalmente nos osteoblastos, exibindo peso molecular de 57 KDa, com bandas adicionais de 37KDa ou 87 KDa.

Os alvéolos coletados foram descongelados e homogenizados utilizando o homogenizador Polytron (T10 Ultra Thurax, IKA®, Alemanha), 3 vezes por 10 segundos com velocidade máxima, em solução de isolamento de proteína (PIS), contendo sacarose 250 mM, EDTA 1 mM, fenil metil sulfonil fluoreto (PMSF) 0,1 mM e fosfato de potássio a 5 mM, pH 7,7. Em seguida, a concentração total de proteína em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford utilizando kit comercial (Bio-Rad Kit®, Hércules, CA, USA) e albumina como padrão de proteína. Os valores obtidos para a absorbância foram submetidos a ajuste por equação linear da reta (Figura 7 e Figura 8). A equação da reta obtida foi:

$$y=0,1145x + 0,0399$$

onde: **y** = absorbância e **x** = concentração de proteínas (µg/µL).

Figura 7 - Determinação da concentração total de proteína pelo método de Bradford no espectrofotômetro

Figura 8 - Gráfico obtido para a equação linear na quantificação protéica

As amostras foram estocadas a -80°C até serem utilizadas para o procedimento de *Western blotting*.

Foram utilizados 50 µg de proteína total de cada amostra por poço e as mesmas foram separadas por tamanho através da eletroforese, de acordo com o peso molecular de cada uma, usando o sistema de gel de poliacrilamida (acrilamida e bisacrilamida) de 10%. A solução tampão utilizada durante a corrida das amostras consiste de: glicina 192 mM, Tris 25 mM, SDS 0,5%, pH 8,3. A eletroforese foi

realizada utilizando a fonte de eletroforese PowerPac[®] Basic Power Supply (Bio-Rad Life Science, Hércules, CA, USA), inicialmente com voltagem de 60 V por 15 min, até as amostras ultrapassarem a marca do primeiro gel (stacking) e posteriormente 120 V, por aproximadamente 60 min, corrigindo a voltagem pela amperagem momentânea que deveria ser constante, para não interferir na corrida das amostras. Simultaneamente, foi utilizado um marcador, Precision Plus Protein[®] all blue Standards, código 161-0373 (Bio-Rad Life Science, CA, USA), como peso molecular padrão. As proteínas foram transferidas eletroforeticamente para uma membrana de nitrocelulose, código 162-0115 (Bio-Rad Life Science, CA, USA), sob voltagem de 120 V por aproximadamente 1h e 20 minutos, em tampão de transferência que consiste de: glicina 192 mM, Tris 25 mM, Metanol 20%, pH 8,3. As membranas foram então lavadas (3x10 minutos) em solução salina tamponada por Tris (TBS), e bloqueada com leite desnatado Molico[®] 5% (Nestlé Brasil Ltda, Araçatuba, São Paulo, Brasil) sem gorduras (NFDM) em TBS por 2h. Em seguida, as membranas foram lavadas em TBS (3x10min) e incubadas nos respectivos anticorpos primários contra COX-2 e RUNX-2 diluídos 1:1.000 com albumina 3%, ficando por toda a noite em temperatura de 4° C. As membranas foram então lavadas em TBS por 30 minutos (3x 10min) e, em seguida, incubadas com anticorpo secundário *anti-rabbit* conjugado com HRP-*horseradish peroxidase* (Bio-Rad Life Sciences, Hércules, CA, USA) contra IgG do anticorpo primário, diluídos 1:10.000 - com albumina 1% por aproximadamente 4h. A detecção do sinal foi realizada pelo método de quimioluminescência, com luminescência química aumentada - SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate - (Pierce, Rockford, IL, USA), e em seguida as membranas foram expostas a filme radiográficos KODAK[®] (Rochester, NY, USA), medical x-ray film – referencia 5253349. Depois disso, os filmes radiográficos foram escaneados (impressora HP Photosmart C4480 all-in-one) e a densitometria das bandas das proteínas foi quantificada através da intensidade de pixels com auxílio do software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados numéricos obtidos foram submetidos ao teste de Gaussianidade (Kolmogorov-Smirnov) e de homogeneidade da variância ou homocedasticidade (Bartlett) e subsequentemente submetidos ao teste “t” Student para comparação de grupos por período e pela análise de variância (ANOVA) para a comparação entre os períodos por grupo, sendo as médias contrastadas pelo teste de Tukey usando software Statistica 7 (Statsoft Inc. Tulsa, Oklahoma, EUA) para Windows com um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS PONDERAIS

Os resultados obtidos para massa corporal dos animais no momento da cirurgia (P_{inicial}) e ao término dos períodos experimentais (P_{final}), bem como o ganho e/ou perda no período pós-cirúrgico ($P_{\text{final}} - P_{\text{inicial}}$) dos diferentes grupos e períodos experimentais estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Comparação entre a massa corporal (g) dos grupos controle e tratado no dia da cirurgia (P_{inicial}), ao término de cada período experimental (P_{final}) e o ganho de massa corporal ($P_{\text{final}} - P_{\text{inicial}}$) pelo teste “t” independente. Média (m), Desvio Padrão (dp) e valores de “p” (p)

Período (dias)	Controle (m±dp)	Tratado (m±dp)	Teste “t” (p)
P_{inicial}			
3	201,59 ± 5,98	260,47 ± 16,92	0,000
7	217,64 ± 17,46	216,67 ± 47,64	0,855
10	196,53 ± 20,57	232,23 ± 21,80	0,034
14	241,00 ± 15,16	190,00 ± 24,40	0,020
21	245,47 ± 23,65	222,03 ± 27,08	0,144
30	260,64 ± 16,21	232,3 ± 27,43	0,033
P_{Final}			
3	207,55 ± 5,53	268,46 ± 16,80	0,000
7	227,5 ± 15,98	245,5 ± 45,52	0,806
10	236,35 ± 24,97	266,64 ± 19,59	0,052
14	274,70 ± 21,86	241,64 ± 25,88	0,079
21	310,32 ± 18,72	277,25 ± 25,74	0,129
30	343,3 ± 11,06	313,2 ± 26,56	0,049
$P_{\text{inicial}} - P_{\text{Final}}$			
3	5,96 ± 2,36	7,99 ± 0,69	0,102
7	11,44 ± 3,10	10,23 ± 2,26	0,498
10	36,58 ± 6,46	34,73 ± 2,88	0,574
14	38,52 ± 8,42	45,22 ± 7,33	0,216
21	59,37 ± 10,68	63,70 ± 10,11	0,681
30	89,47 ± 15,71	96,41 ± 10,49	0,435

A análise da Tabela 2 juntamente com a análise estatística dos dados mostrou que:

- a) o P_{inicial} dos animais do grupo controle foi 0,226 e 0,154 vezes menor aos 3 e 10 dias, respectivamente, e 0,268 e 0,121 vezes maior aos 14 e 30 dias, respectivamente, em relação ao do grupo tratado, enquanto que aos 7 e 21 dias não houve diferenças entre grupos ($p>0,05$).
- b) porém, o P_{final} dos animais do grupo controle foi 0,226 vezes menor apenas aos 3 dias e 0,096 vezes maior aos 30 dias em relação aos do grupo tratado, enquanto que aos 7, 10, 14 e 21 dias não apresentaram diferenças entre grupos ($p>0,05$).
- c) a diferença entre as massas corporais final e inicial ($P_{\text{final}} - P_{\text{inicial}}$) mostrou que houve um ganho proporcional de massa corporal entre os grupos por períodos.

4.2 VOLUME TOTAL DO ALVÉOLO

O volume total do alvéolo (mm^3) após a extração do incisivo dos animais dos grupos controle e tratado nos diversos períodos analisados bem como a análise estatística dos dados, encontram-se apresentados na Tabela 3 e na Figura 9.

Tabela 3 - Comparação do volume total do alvéolo (mm³) do grupo controle e tratado por período pelo Teste “t” independente e entre períodos dentro do mesmo grupo pela ANOVA a um critério. Média (M), Desvio Padrão (DP) e valores de “p” (P)

Período (dias)	Volume Total do Alvéolo (mm ³)		Teste “t” (P)
	Controle (M±DP)	Tratado (M±DP)	
3	31,378 ± 3,15 ^a	32,439 ± 3,21 ^a	0,612
7	30,456 ± 4,84 ^{a,b}	33,470 ± 4,39 ^a	0,333
10	30,334 ± 5,90 ^{a,b}	33,344 ± 4,52 ^a	0,561
14	30,240 ± 4,31 ^{a,b}	28,270 ± 5,15 ^{a,b}	0,530
21	23,269 ± 2,94 ^b	30,495 ± 2,42 ^{a,b}	0,002
30	23,183 ± 2,42 ^b	23,591 ± 5,66 ^b	0,885
ANOVA (P)	0,005 Letras diferentes p<0,05	0,015 Letras diferentes p<0,05

Figura 9 – Volume total do alvéolo (mm^3) durante o processo de reparo do alvéolo dental após a extração do incisivo nos grupos controle e tratado dos diversos períodos analisados. Asterisco (*) - $p < 0,05$ para comparação entre grupos por período

A análise da **Tabela 3** e da **Figura 9** juntamente com a análise estatística dos dados mostrou que:

- o volume total do alvéolo não apresentou diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) entre grupos por período, exceto aos 21 dias, quando o volume do alvéolo do grupo controle foi 0,236 vezes menor em relação ao grupo tratado;
- o volume total do alvéolo aos 3 dias no grupo controle foi de $31,378 \text{ mm}^3$ e manteve-se constante até os 14 dias. Porém, aos 21 dias, o volume do alvéolo foi 0,258 vezes menor em relação ao período 3 dias e manteve-se constante até os 30 dias;
- o volume total do alvéolo aos 3 dias no grupo tratado foi de $32,439 \text{ mm}^3$ e manteve-se constante até os 21 dias. Porém, aos 30 dias, o volume do alvéolo foi 0,272 vezes menor em relação ao período 3 dias e com valores similares aos do grupo controle aos 21 dias.

4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS CORTES HISTOLÓGICOS CORADOS PELA TÉCNICA DE HE

Os resultados morfológicos dos cortes dos alvéolos dentais do grupo controle e tratado nos diversos períodos analisados estão representados nas **Figuras 10-13**.

a) Período de 3 e 7 dias pós-exodontia

Na **região apical e coronal**, no grupo controle (Fig. 10C1 e 10C3), o alvéolo dental apresentou-se preenchido por grande quantidade de tecido conjuntivo e por restos do coágulo sanguíneo com pequenas áreas de reabsorção da cortical óssea e de neoformação óssea sempre associada a cortical óssea alveolar, enquanto que, no grupo tratado (Fig. 10T1 e 10T3) ocorreu predominância de coágulo sanguíneo, pouca quantidade de tecido conjuntivo e raras áreas de formação óssea associada a cortical alveolar praticamente íntegra. Na **região média**, em ambos os grupos controle (Fig. 10C2) e tratado (Fig. 10T2) os alvéolos mostraram-se preenchidos por grande quantidade de coágulo sanguíneo.

b) Período de 10 e 14 dias pós-exodontia

Na **região apical**, no grupo controle (Fig. 11C1) o alvéolo apresentou-se preenchido por grande quantidade de tecido conjuntivo, restos de coágulo sanguíneo e tecido ósseo de arranjo trabecular. Já, no grupo tratado (Fig. 11T1), grande parte do alvéolo mostrava-se ainda preenchido pelo coágulo sanguíneo como observado no período anterior. Na **região média e coronal**, no grupo controle (Figs. 11C2 e 11C3) o alvéolo exibia grande formação de tecido ósseo de arranjo trabecular principalmente próximo a cortical, ficando a região central e os espaços entre as trabéculas ósseas, ocupados por tecido conjuntivo e restos de coágulo sanguíneo. Já, no grupo tratado (Figs. 11T2 e 11T3) a formação óssea mostrou-se menos intensa e a quantidade de coágulo sanguíneo mais evidente em relação ao grupo controle (Comparar as figuras Figs. 11C2 com 11T2 e 11C3 com 11T3).

c) Período de 21 dias pós-exodontia

Na **região apical**, no grupo controle (Fig. 12C1) a formação óssea ocupava apenas algumas regiões do alvéolo (cerca de 1/3 do alvéolo) e exibia maior grau de maturidade em relação ao período anterior. O restante do alvéolo mostrou-se preenchido por tecido conjuntivo ricamente celularizado e vascularizado, porém mais organizado que no período anterior. Já, no grupo tratado (Fig. 12T1), o processo de reparo mostrou-se mais atrasado em relação ao controle, com pequena formação de osso imaturo na superfície da cortical óssea alveolar e o restante do alvéolo ocupado em grande parte pelo coágulo sanguíneo e por tecido conjuntivo. Na **região média** e **coronal**, embora no grupo controle o processo de reparo se mostrasse mais adiantado em relação ao tratado, ambos exibiram intensa formação óssea centrípeta (a partir das bordas em direção ao centro do alvéolo), ficando a região central ocupada por tecido conjuntivo e coágulo sanguíneo.

d) Período de 30 dias pós-exodontia

Na **região apical**, o grupo controle (Fig. 13C1) apresentou quadro histológico similar ao do período anterior, porém, as trabéculas mostravam-se mais espessas. No grupo tratado (Fig. 13T1) a quantidade de tecido ósseo mostrava-se similar ao do grupo controle, porém, o coágulo sanguíneo ainda estava presente. Na **região média** e **coronal**, em ambos os grupo controle (Fig. 13C2 e 13C3) e tratado (Fig. 13T2 e 13T3) ocorreu redução do tamanho do alvéolo e alteração do seu contorno devido a intensa reabsorção da cortical óssea alveolar observada em todos os períodos. O tecido ósseo formado exibia acentuado aumento na espessura das trabéculas, adquirindo um arranjo mais compacto com alguns espaços ocupados por medula óssea, ficando apenas algumas regiões ainda ocupadas pelo tecido conjuntivo e restos de coágulo sanguíneo.

Figura 10 - Fotomicrografia do alvéolo dental após 3 dias de extração do incisivo. **Região apical:** observar no grupo controle (C1) o preenchimento do alvéolo por tecido conjuntivo (Tc) e restos de coágulo sanguíneo (Co) enquanto que, no grupo tratado (T1) ocorre o predomínio do coágulo sanguíneo (Co). **Região média:** Em ambos os grupos controle (C2) e tratado (T2) predomínio de coágulo sanguíneo (Co) no interior do alvéolo. **Região cervical:** como observado na região apical, o alvéolo no grupo controle (C3) mostra-se preenchido proporcionalmente por coágulo sanguíneo (Co) e tecido conjuntivo (Tc), enquanto que no grupo tratado (T3) ocorre o predomínio de coágulo sanguíneo (Co).

Figura 11 - Fotomicrografia do alvéolo dental após 14 dias de extração do incisivo. **Região apical:** observar no grupo controle (C1) preenchimento do alvéolo por tecido conjuntivo (Tc) com pouca quantidade de coágulo sanguíneo (Co) e pequena formação óssea nas bordas e no interior do alvéolo. Já no grupo tratado (T1) ocorre o predomínio do coágulo sanguíneo (Co) com pouca quantidade de tecido conjuntivo (Tc). **Região média:** observar grupo controle (C2) uma diminuição do tecido conjuntivo (Tc) e Coágulo sanguíneo (Co) e a presença de formação óssea (asterisco) localizada na borda e na região central do alvéolo. No grupo tratado (T2) predomínio de coágulo sanguíneo (Co) e tecido conjuntivo (Tc) com pouca formação óssea (asterisco). **Região cervical:** em ambos os grupos controle (C3) e tratado (T3) apresentam formação óssea (asterisco) no interior do alvéolo, sendo que no grupo tratado ocorre a presença de grande quantidade de coágulo sanguíneo (Co) entre as trabéculas ósseas.

Figura 12 - Fotomicrografia do alvéolo dental após 21 dias de extração do incisivo. **Região apical:** observar no grupo controle (C1) preenchimento do alvéolo por tecido conjuntivo (Tc) pequena formação óssea nas bordas e no interior do alvéolo. Já no grupo tratado (T1) ocorre o predomínio do coágulo sanguíneo (Co) com pouca quantidade de tecido conjuntivo (Tc) e pouca formação óssea (asterisco). **Região média:** observar grupo controle (C2) a presença coágulo sanguíneo (Co) com tecido conjuntivo (Tc) e grande quantidade de trabéculas ósseas no interior do alvéolo (asterisco). No grupo tratado (T2) predomínio de coágulo sanguíneo (Co) e tecido conjuntivo (Tc) com pouca formação óssea (asterisco). **Região cervical:** em ambos os grupos controle (C3) e tratado (T3) apresentam formação óssea (asterisco) no interior do alvéolo, sendo que no grupo experimental ocorre a presença de grande quantidade de coágulo sanguíneo (Co) entre as trabéculas ósseas (asteriscos).

Figura 13 - Fotomicrografia do alvéolo dental após **30 dias** de extração do incisivo. **Região apical:** observar no grupo controle (C1) preenchimento do alvéolo por tecido conjuntivo (Tc) e formação óssea nas bordas e no interior do alvéolo. Já no grupo tratado (T1) poucas trabéculas ósseas (asterisco) localizam-se no interior do alvéolo e entre o coágulo sanguíneo (Co) e tecido conjuntivo (Tc). **Região média:** observar grupo controle (C2) a presença de tecido conjuntivo (Tc) e grande quantidade de trabéculas ósseas (asterisco) no interior do alvéolo. No grupo tratado (T2), o coágulo sanguíneo (Co) e tecido conjuntivo (Tc) dividem espaço com as trabéculas ósseas (asterisco) presentes nas bordas e no centro do alvéolo. **Região cervical:** em ambos os grupos controle (C3) e tratado (T3) apresentam formação óssea (asterisco) no interior do alvéolo, sendo que no grupo tratado ainda ocorre a presença de coágulo sanguíneo.

4.4 DENSIDADE DE VOLUME DE TECIDO ÓSSEO

Os resultados de densidade de volume (%) de tecido ósseo neoformado no processo de reparo do alvéolo dental após a extração do incisivo dos grupos controle e tratado nos diversos períodos analisados, encontram-se apresentados nas Tabelas 4 e na Figura 14.

Tabela 4 - Comparação entre a densidade de volume (%) do tecido ósseo do grupo controle e tratado por período pelo Teste “t” independente e entre períodos dentro do mesmo grupo pela ANOVA a um critério. Média (M), Desvio Padrão (DP) e valores de “p” (P)

Período (dias)	Densidade de tecido ósseo (%)		Teste “t” (P)
	Controle (M±DP)	Tratado (M±DP)	
3	14,25 ± 4,84 ^a	7,84 ± 0,84 ^a	0,019
7	21,85 ± 3,42 ^{a,b}	17,40 ± 2,11 ^{a,b}	0,038
10	29,99 ± 3,13 ^{b,c}	21,92 ± 5,53 ^{b,c}	0,034
14	35,48 ± 2,59 ^c	25,18 ± 3,29 ^{b,c}	0,001
21	45,65 ± 8,41 ^d	31,40 ± 7,44 ^c	0,022
30	52,45 ± 5,55 ^d	46,11 ± 9,84 ^d	0,245
ANOVA (P)	0,000 Letras diferentes p<0,05	0,000 Letras diferentes p<0,05

Figura 14 - Densidade de volume (%) do tecido ósseo durante o processo de reparo do alvéolo dental após a extração do incisivo nos grupos controle e tratado dos diversos períodos analisados. Asterisco (*) - $p < 0,05$ para comparação entre grupos por período.

A análise da **Tabela 4** e da **Figura 14** juntamente com a análise estatística dos dados mostrou que:

- a) a densidade de volume do tecido ósseo no grupo controle foi 0,817, 0,255, 0,368, 0,409 e 0,453 vezes maior em relação ao grupo tratado nos períodos de 3, 7, 10, 14 e 21, respectivamente. Aos 30 dias a densidade de volume de tecido ósseo foi similar entre os grupos controle e tratado;
- b) a densidade de volume do tecido ósseo no grupo controle e tratado foi de, respectivamente, 21,85 e 17,40%, não apresentando diferenças estatisticamente significantes com os respectivos valores aos 7 dias. Em seguida, o percentual de tecido ósseo do grupo controle aumentou gradativamente até os 21 dias passando a ocupar 45,65% do alvéolo. Embora o percentual de tecido ósseo passe a ocupar 52,45% aos 30 dias, não se observou diferenças estatísticas entre 21 e 30 dias. No grupo tratado a densidade de volume do tecido ósseo aumentou gradativamente até os 30 dias, passando a ocupar 46,11%.

4.5 VOLUME TOTAL DE TECIDO ÓSSEO (mm³)

Os resultados do volume total do tecido ósseo (mm³) dos componentes envolvidos no processo de reparo do alvéolo dental após a extração do incisivo dos grupos controle e tratado nos diversos períodos analisados, encontram-se apresentados na **Tabela 5** e na **Figura 15**.

Tabela 5 - Comparação do volume total de tecido ósseo (mm³) do grupo controle e tratado por período pelo Teste “t” independente e entre períodos dentro do mesmo grupo pela ANOVA a um critério. Média (M), Desvio Padrão (DP) e valores de “p” (P)

Período (dias)	Volume Total do Tecido Ósseo (mm ³)		Teste “t” (P)
	Controle (M±DP)	Tratado (M±DP)	
3	4,402 ± 1,41 ^a	2,547 ± 0,40 ^a	0,022
7	6,736 ± 1,85 ^{a,b}	5,807 ± 0,87 ^{a,b}	0,340
10	8,956 ± 1,02 ^{b,c}	7,458 ± 2,32 ^{b,c}	0,224
14	10,703 ± 1,46 ^{c,d}	7,092 ± 1,43 ^{b,c}	0,004
21	10,554 ± 1,88 ^{c,d}	9,637 ± 2,71 ^{b,c}	0,552
30	12,139 ± 1,54 ^d	10,724 ± 3,19 ^c	0,398
ANOVA (P)	0,000 Letras diferentes p<0,05	0,000 Letras diferentes p<0,05

Figura 15 – Volume total de tecido ósseo (mm³) durante o processo de reparo do alvéolo dental após a extração do incisivo nos grupos controle e tratado dos diversos períodos analisados. Asterisco (*) - $p < 0,05$ para comparação entre grupos por período.

A análise da **Tabela 5** e da **Figura 15** juntamente com a análise estatística dos dados mostrou que:

- o volume total de tecido ósseo no alvéolo não apresentou diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) entre grupos por período, exceto aos 3 e 14 dias, quando o volume foi, respectivamente, 0,728 e 0,509 vezes maior no grupo controle em relação ao tratado;
- o volume de tecido ósseo aos 3 dias no grupo controle foi de 4,402 mm³, enquanto que, no grupo tratado foi de apenas 2,547 mm³, mantendo-se constante até os 7 dias. Aos 14 dias, o volume de tecido ósseo no grupo controle e tratado foi, respectivamente, 1,431 e 1,784 vezes maior em relação ao período 3 dias, mantendo-se constante até os 30 dias ($p > 0,05$).

4.6 IMUNOMARCAÇÃO PARA COX-2

Os resultados morfológicos da imunomarcação para **COX-2** dos cortes dos grupos controle e tratado estão representado nas Figuras 16 a 21.

Nos períodos de **3 dias** (Fig. 16) e **7 dias** (Fig. 17), em ambos os grupos, controle (C1-C3) e tratado (T1-T3), ocorreu imunomarcação para a COX-2 em osteoblastos altamente ativos e nos osteócitos recém aprisionados na matriz óssea. No tecido conjuntivo/granulação presente no interior do alvéolo, células tipo fibroblastos, fibroblastos típicos e células endoteliais apresentavam imunomarcação para COX-2. Como o grupo controle apresentava maior formação óssea e um tecido conjuntivo rico em células e vasos sanguíneos, a marcação para o COX-2 mostrou-se mais expressiva neste grupo em relação ao tratado.

Nos períodos de **10 dias** (Fig. 18) e **14 dias** (Fig. 19) em ambos os grupos, controle (C1-C3) e tratado (T1-T3) ocorreu gradual aumento das trabéculas ósseas recém formadas a partir da cortical óssea em direção ao centro do alvéolo, apresentando osteoblastos ativos e osteócitos imunomarcados para COX-2. Os vasos sanguíneos localizavam-se principalmente próximos às áreas de formação óssea e tanto as células endoteliais quanto os fibroblastos mostravam-se imunomarcados para COX-2, enquanto que, no tecido conjuntivo mais distante das áreas de formação óssea havia poucas células imunomarcadas.

No período de **21 dias** (Fig. 20) em ambos os grupos, controle (C1-C3) e tratado (T1-T3) ocorreu intensa marcação para COX-2 em osteoblastos, tanto nos altamente ativos quanto nos de revestimento, principalmente nas áreas de formação dos canais nutritivos e raramente em osteócitos. Nas áreas de formação dos canais nutritivos, os fibroblastos e algumas células endoteliais apresentavam-se imunomarcadas para COX-2. Aos **30 dias** (Fig. 21), o padrão de marcação foi similar ao do período de 21 dias, porém em menor intensidade.

Figura 16- Fotomicrografia do alvéolo dentário imunomarcado para COX-2 após **3 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no tratado (T1-T3) pequena formação óssea na superfície da cortical alveolar (asterisco) exibindo células ósseas imunomarcadas (seta verde) caracterizadas por osteoblastos ativos e recém aprisionados na matriz extracelular. Notar também, no interior do alvéolo, a presença de vários tipos celulares imunomarcados, como células tipo fibroblastos (seta vermelha), células endoteliais (seta preta) presentes no tecido conjuntivo (TC). Objetivas de 40X e 100X.

Figura 17 - Fotomicrografia do alvéolo dentário imunomarcados para COX-2 após **7 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no tratado (T1-T3) maior formação óssea na superfície da cortical alveolar (asterisco) e o aumento na vascularização (VS) em relação ao período anterior. Notar que, no grupo controle (C1 e C2) as trabéculas ósseas mostram-se mais organizadas com imunomarcção em osteoblastos (setas verdes) dispostos linearmente sobre a superfície da matriz óssea, com imunomarcações em células recém aprisionadas (setas azuis) e nas células do tecido conjuntivo (TC). No grupo tratado (T1) a formação óssea é menos expressiva e mais imatura em relação ao grupo controle. Neste caso, os osteoblastos (setas verdes) também exibem imunomarcção, porém, estão dispostos desorganizadamente na superfície da matriz. Notar que, nos grupos controle e tratado algumas células do tecido conjuntivo (TC) e endoteliais (seta preta) exibem imunomarcção, sendo que no grupo controle há uma formação óssea mais avançada e organizada. Objetivas de 40X e 100X.

Figura 18 - Fotomicrografia do alvéolo dentário imunomarcados para COX-2 após **10 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no tratado (T1-T3) maior formação óssea em relação ao período anterior. Em ambos os grupos, as imunomarcações para COX-2 estão presentes em osteoblastos (setas verdes) presentes na superfície das trabéculas ósseas, nos osteoblastos recém aprisionados (setas azuis) na matriz óssea e nas células endoteliais (seta preta) dos vasos sanguíneos (VS) . Notar a grande quantidade de vasos sanguíneos (VS) entre as trabéculas ósseas (estrelas) e algumas células do tecido conjuntivo (TC) imunomarcadas. Objetivas de 40X e 100X .

Figura 19 - Fotomicrografia do alvéolo dentário imunomarcados para COX-2 após **14 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no tratado (T1-T3) o mesmo padrão de marcação em relação aos períodos anteriores, ou seja, em osteoblastos (setas verdes) na superfície das trabéculas ósseas, nos osteoblastos recém aprisionados (setas azuis) na matriz óssea e células endoteliais (setas pretas). Notar, no grupo controle maior espessamento das trabéculas ósseas em relação ao grupo tratado. Notar também a grande quantidade de vasos sanguíneos (VS) entre as trabéculas ósseas e raras células do tecido conjuntivo (TC) imunomarcadas. Objetivas de 40X e 100X.

Figura 20 - Fotomicrografia do alvéolo dentário imunomarcados para COX-2 após **21 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no tratado (T1-T3) o mesmo padrão de marcação em relação aos períodos anteriores, ou seja, em osteoblastos (setas verdes) na superfície das trabéculas ósseas (asterisco), nos osteoblastos recém aprisionados (setas azuis) na matriz óssea e nas células endoteliais (setas pretas). Notar também, o maior espessamento das trabéculas ósseas (asterisco) em relação ao período anterior, e a grande quantidade de vasos sanguíneos (VS) entre as trabéculas ósseas e a ausência de imunomarcagem nas células do tecido conjuntivo (TC). Objetivas de 40X e 100X.

Figura 21 -Fotomicrografia do alvéolo dentário imunomarcados para COX-2 após **30 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no tratado (T1-T3) padrão de marcação similar ao do período anterior, ou seja, nos osteoblastos (setas verdes) presentes na superfície ósseas, nos osteoblastos recém aprisionados (setas azuis) na matriz óssea e nas células endoteliais (setas pretas) . No grupo tratado há maior imunomarcacão quando comparado ao grupo controle. Observar também, vasos sanguíneos (VS) próximos ao tecido ósseo. Objetivas de 40X e 100X .

4.7 NÚMERO DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS PARA COX-2/mm²

Os resultados do número de células imunomarcadas para COX-2 por mm² no processo de reparo do alvéolo dentário após a extração do incisivo dos grupos controle e tratado nos diversos períodos analisados encontram-se apresentados na **Tabela 6** e na **Figura 22**.

Tabela 6 - Comparação entre o número de células imunomarcadas para o **COX-2** por mm² dos grupos controle e tratado por período pelo Teste “t” independente e entre períodos dentro do mesmo grupo pela ANOVA a um critério. Média (M), Desvio Padrão (DP) e valores de “p” (P).

Período (dias)	COX-2 (mm ²)		Teste “t” (P)
	Controle (M±DP)	Tratado (M±DP)	
3	877,22 ± 102,38 ^a	758,52 ± 121,69 ^a	0,186
7	897,04 ± 166,41 ^a	749,70 ± 163,19 ^{a,b}	0,252
10	737,32 ± 87,38 ^{a,b}	662,76 ± 87,14 ^{a,b,c}	0,272
14	690,58 ± 107,66 ^{a,b,c}	516,41 ± 109,46 ^{b,c,d}	0,063
21	556,49 ± 39,89 ^{b,c}	491,45 ± 56,96 ^{c,d}	0,110
30	474,19 ± 71,09 ^c	336,68 ± 60,57 ^d	0,025
ANOVA (P)	0,000 Letras diferentes p<0,05	0,000 Letras diferentes p<0,05

Figura 22 – Número de células imunomarcadas para COX-2 por mm² durante o processo de reparo do alvéolo dentário após a extração do incisivo nos grupos controle e tratado dos diversos períodos analisados. Asterisco (*) - $p < 0,05$ para comparação entre grupos por período.

A análise da **Tabela 6** e da **Figura 22** juntamente com a análise estatística dos dados mostrou que:

- o número de células imunomarcadas para COX-2 não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos diferentes períodos analisados, exceto aos 30 dias onde o grupo controle foi 0,408 vezes maior em relação ao grupo tratado.
- em relação a cada grupo individualmente, verificou-se que no grupo controle o número de células imunomarcadas aos 3 dias foi de 877,22 células/mm², diminuindo gradativamente 0,356 vezes até o período de 21 dias, permanecendo constante até os 30 dias. Já, no grupo tratado, aos 3 dias o número de células foi de 758,52 células/mm² permanecendo constante até os 10 dias, porém aos 14 dias o número de células imunomarcadas foi de 0,319 vezes menor em relação ao período de 3 dias permanecendo constante até os 30 dias.

4.8 IMUNOMARCAÇÃO PARA RUNX-2

Os resultados morfológicos da imunomarcção para **RUNX-2** dos cortes dos grupos controle e tratado estão representado nas Figuras 23 a 28.

Nos períodos de **3 dias** (Fig. 23) e **7 dias** (Fig. 24), como o observado para a proteína COX-2, em ambos os grupos, controle (C1-C3) e tratado (T1-T3), ocorreu imunomarcção para o RUNX-2 em osteoblastos altamente ativos e nos osteócitos recém aprisionados na matriz óssea. No tecido conjuntivo/de granulação presente no interior do alvéolo, células tipo fibroblastos, fibroblastos típicos e algumas células endoteliais apresentavam imunomarcção para RUNX-2. Assim, como o grupo controle apresentava maior formação óssea e um tecido conjuntivo mais rico em células e vasos sanguíneos que o tratado, a marcação para o RUNX-2 mostrou-se mais expressiva neste grupo.

Nos períodos de **10 dias** (Fig. 25) e **14 dias** (Fig. 26) em ambos os grupos, controle (C1-C3) e tratado (T1-T3) ocorreu gradual aumento das trabéculas ósseas recém formadas a partir da cortical óssea em direção ao centro do alvéolo, apresentando osteoblastos ativos, osteócitos e algumas células do tecido conjuntivo imunomarcadas para RUNX-2. Porém, no grupo controle notou-se uma maior quantidade de trabéculas ósseas neoformadas evidenciando mais células imunomarcadas em relação ao grupo tratado.

No período de **21 dias** (Fig. 27) e aos **30 dias** (Fig. 28) em ambos os grupos, controle (C1-C3) e tratado (T1-T3) ocorreu intensa marcação para RUNX-2 em osteoblastos, tanto nos altamente ativos quanto nos de revestimento, principalmente nas áreas de formação e remodelação óssea. Nas áreas de formação dos canais nutritivos, uma grande quantidade de fibroblastos e algumas células endoteliais apresentavam-se imunomarcadas para RUNX-2. Como observado nos grupos anteriores ocorreu predomínio de células imunomarcadas no grupo Controle em relação ao tratado.

Figura 23 - Fotomicrografia do alvéolo dentário imunomarcado para RUNX-2 após **3 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no grupo tratado (T1-T3) pequena formação óssea na superfície da cortical alveolar (asterisco) exibindo uma grande quantidade de células ósseas imunomarcadas (setas amarelas) caracterizadas por osteoblastos ativos e recém aprisionados na matriz extracelular. Notar também, no grupo controle, a predominância de células tipo fibroblastos imunomarcadas (setas vermelhas) em relação ao grupo tratado que apresenta grande quantidade de fibroblastos sem imunomarcção (seta azul) no tecido conjuntivo (TC). Objetivas de 40X e 100X.

Figura 24 - Fotomicrografia do alvéolo dentário imunomarcado para RUNX-2 após **7 dias** da extração do incisivo. Observar nos grupo controle (C1-C3) e tratado (T1-T3) um grande número de células imunomarcadas na superfície da cortical alveolar (asterisco) e o início da neoformação óssea – trabéculas ósseas (TO). Notar que, no grupo controle as trabéculas ósseas mostram-se organizadas com imunomarcagem em osteoblastos (setas amarelas), células recém aprisionadas na matriz óssea (setas azuis) e nas células do tecido conjuntivo (TC). Notar que, no grupo tratado (T3) a maioria das células ósseas recém-aprisionadas não exibem imunomarcagem (cabeça de seta). Notar ainda, que no grupo controle existe uma predominância de células do tecido conjuntivo imunomarcadas. Objetivas de 40X e 100X.

Figura 25 - Fotomicrografia do alvéolo dentário imunomarcado para RUNX-2 após **10 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no tratado (T1-T3) maior formação óssea em relação ao período anterior. Notar, em ambos os grupos, que as imunomarcações para RUNX-2 continuam presentes em osteoblastos (setas amarelas), presentes na superfície das trabéculas ósseas, e nos recém aprisionados (setas azuis) na matriz óssea. Notar, principalmente no grupo controle (C1-C3) uma maior quantidade de trabéculas ósseas (setas vermelhas) e de algumas células do tecido conjuntivo (TC) imunomarcadas, em relação ao grupo tratado. Objetivas de 40X e 100X.

Figura 26 - Fotomicrografia do alvéolo dentário imunomarcados para RUNX-2 após **14 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no grupo tratado (T1-T3) o mesmo padrão de marcação em relação aos períodos anteriores, ou seja, em osteoblastos (setas amarelas) na superfície das trabéculas ósseas e nos recém aprisionados (setas azuis) na matriz óssea. Notar, no grupo controle maior espessamento das trabéculas ósseas em relação ao grupo tratado. Notar também uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado (TO) circundado pelo tecido conjuntivo (TC) com predominância de células imunomarcadas no grupo controle (cabeça de seta) em relação ao grupo tratado. Objetivas de 40X e 100X.

Figura 27 - Fotomicrografia do alvéolo dentário imunomarcado para RUNX-2 após **21 dias** da extração do incisivo. Observar tanto no grupo controle (C1-C3) como no grupo tratado (T1-T3) o mesmo padrão de marcação em relação aos períodos anteriores, ou seja, em osteoblastos (setas amarelas) na superfície das trabéculas ósseas (asterisco) e nos recém aprisionados (setas azuis) na matriz óssea, porém com intensidade menor. Notar também, o maior espessamento das trabéculas ósseas (asterisco) em relação ao período anterior, e o aumento de imunomarcagem nas células do tecido conjuntivo (TC-cabeça de seta) no grupo tratado (T3). Objetivas de 40X e 100X.

Figura 28 - Fotomicrografia do alvéolo dentário imunomarcado para RUNX-2 após **30 dias** da extração do incisivo. Observar que, tanto no grupo controle (C1-C3) como no grupo tratado (T1-T3) o padrão de marcação é similar ao do período anterior, ou seja, nos osteoblastos (setas amarelas) presentes na superfície óssea e nos recém aprisionados (setas azuis) na matriz óssea, com predominância de células imunomarcadas (cabeças de seta) no tecido conjuntivo do grupo controle em relação do grupo tratado (T3), que apresenta grande quantidade de células do tecido conjuntivo sem imunomarcação (setas vermelhas).

4.9 NÚMERO DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS PARA RUNX-2/mm²

Os resultados do número de células imunomarcadas para RUNX-2 por mm² no processo de reparo do alvéolo dentário após a extração do incisivo dos grupos controle e tratado nos diversos períodos analisados encontram-se apresentados na **Tabela 7** e na **Figura 29**.

Tabela 7 - Comparação entre o número de células imunomarcadas para o **RUNX-2** por mm² dos grupos controle e tratado por período pelo Teste “t” independente e entre períodos dentro do mesmo grupo pela ANOVA a um critério. Média (M), Desvio Padrão (DP) e valores de “p” (P).

Período (dias)	Número de células RUNX-2 + / (mm ²)		Teste “t” (P)
	Controle (M±DP)	Tratado (M±DP)	
3	1014,53 ± 64,66 ^a	726,77 ± 79,06 ^a	0,001
7	1095,39 ± 56,61 ^a	971,54 ± 63,43 ^{b,c}	0,026
10	1358,88 ± 54,74 ^b	838,81 ± 48,15 ^{a,b,c}	0,000
14	1021,14 ± 52,10 ^a	869,39 ± 64,36 ^{b,c}	0,010
21	1229,30 ± 66,70 ^c	892,89 ± 36,86 ^{b,c}	0,000
30	726,66 ± 30,33 ^d	493,31 ± 61,89 ^d	0,000
ANOVA (P)	0,000 Letras diferentes p<0,05	0,000 Letras diferentes p<0,05

Figura 29 – Número de células imunomarcadas para RUNX-2 por mm² durante o processo de reparo do alvéolo dentário após a extração do incisivo nos grupos controle e tratado dos diversos períodos analisados. Asterisco (*) - $p < 0,05$ para comparação entre grupos por período.

A análise da **Tabela 7** e da **Figura 29** juntamente com a análise estatística dos dados mostrou que:

- o número de células imunomarcadas para RUNX-2 apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos diferentes períodos experimentais analisados;
- em relação a cada grupo individualmente, verificou-se que no grupo controle o número de células imunomarcadas aos 3 dias foi de 1014,53 células/mm², aumentando gradativamente 0,339 vezes até o período de 10 dias, porém aos 30 dias o número de células foi 0,396 vezes menor em relação ao período inicial. Já, no grupo tratado, aos 3 dias o número de células foi de 726,77 células/mm², aumentando 0,154 vezes aos 10 dias e permanecendo constante até os 21 dias, porém, o número de células imunomarcadas aos 30 dias foi de 493,31 células/mm², diminuindo 0,473 vezes em relação ao período de 3 dias.

4.10 DENSITOMETRIA DA ANÁLISE PROTÉICA POR *WESTERN BLOTTING* PARA A COX-2

Os resultados densitométricos obtidos da análise protéica por *Western blotting* para a COX-2 dos grupos controle e tratado estão apresentados na Tabela 8 e nas Figuras 30 e 31.

Tabela 8 - Valores densitométricos obtidos para a COX-2 nos grupos controle e tratado nos diferentes períodos pós-exodontia

Período (dias)	Valores densitométricos para as Bandas de COX-2		Teste "t"
	Controle (m±dp)	Tratado (m±dp)	(p)
3	13955,75 ± 529,37	8876,00 ± 106,47	0,000
7	10677,00 ± 403,73	6980,00 ± 220,51	0,000
10	13757,00 ± 121,08	10881,60 ± 549,43	0,000
14	16148,25 ± 579,36	13611,40 ± 819,04	0,001
21	11404,50 ± 324,19	10297,60 ± 1395,40	0,169
30	14078,40 ± 604,57	14167,75 ± 317,06	0,798

Figura 30 - Valores densitométricos das bandas obtidas por *Western blotting* para a proteína COX-2 durante o reparo ósseo alveolar em ratos nos diferentes períodos analisados. Asterisco (*) - $p < 0,05$ para comparação entre grupos por período.

Figura 31 - Imagens obtidas das películas radiográficas das bandas obtidas para a proteína COX-2 por *Western blotting* para os grupos controle e tratado para cada período

A análise da Tabela 8 e das Figuras 30 e 31 juntamente com a análise estatística dos dados mostrou que:

- a) os valores densitométricos obtidos para a proteína COX-2 apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais, nos períodos de 3, 7, 10 e 14 dias.
- b) a expressão protéica para COX-2 no grupo controle foi em média 0,332 vezes maior em relação ao grupo tratado entre 3 e 21 dias e 0,06 vezes menor aos 30 dias.

4.11 DENSITOMETRIA DA ANÁLISE PROTÉICA POR *WESTERN BLOTTING* PARA O RUNX-2

Os resultados densitométricos obtidos da análise protéica por *Western blotting* para o RUNX-2 dos grupos controle e tratado estão apresentados nas Tabelas 9 e 10 e nas Figuras 32 e 33.

Tabela 9 - Valores densitométricos obtidos para o RUNX-2 nos grupos controle e tratado nos diferentes períodos pós-exodontia

Período (dias)	Valores densitométricos para as Bandas de RUNX-2 (banda 57KDa)		Teste “t”
	Controle (m±dp)	Tratado (m±dp)	(p)
3	14833,75 ± 954,61	7763,80 ± 148,53	0,000
7	12876,50 ± 1173,73	7960,40 ± 319,08	0,000
10	13641,25 ± 379,91	9458,60 ± 569,26	0,000
14	14200,00 ± 666,55	8687,60 ± 451,13	0,000
21	12786,50 ± 542,10	11868,80 ± 963,71	0,135
30	11113,60 ± 944,17	12655,50 ± 349,33	0,018

Tabela 10 - Valores densitométricos obtidos para o RUNX-2 nos grupos controle e tratado nos diferentes períodos pós-exodontia

Período (dias)	Valores densitométricos para as Bandas de RUNX-2 (banda 37KDa)		Teste “t”
	Controle (m±dp)	Tratado (m±dp)	(p)
3	12759,50 ± 1457,74	4561,80 ± 575,55	0,000
7	10896,25 ± 1340,96	7413,40 ± 728,65	0,002
10	11822,50 ± 403,76	7123,80 ± 971,93	0,000
14	11349,25 ± 283,80	4810,80 ± 850,01	0,000
21	10226,75 ± 397,37	11326,20 ± 1083,13	0,098
30	9088,20 ± 1675,67	11849,75 ± 960,37	0,023

Figura 32 - Valores densitométricos das bandas obtidas por *Western blotting* para a proteína RUNX-2 durante o reparo ósseo alveolar em ratos nos diferentes períodos analisados. Asterisco (*) - $p < 0,05$ para comparação entre grupos por período.

Figura 33 - Imagens obtidas das películas radiográficas das bandas obtidas para a proteína RUNX-2 por *Western blotting* para os grupos controle e tratado para cada período

Para todas as proteínas em todos os períodos, os valores densitométricos para o controle interno, realizado com *α -tubulina* não apresentaram diferenças estatisticamente significante entre os grupos.

A análise das Tabelas 9 e 10 e das Figuras 32 e 33 juntamente com a análise estatística dos dados mostrou que:

- a) os valores densitométricos obtidos para a proteína RUNX-2, para ambos pesos moleculares exibidos na Fig. 32, apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais, nos períodos de 3, 7, 10, 14 e 30 dias;

- b)** a expressão protéica para RUNX-2 para as bandas de 57KDa no grupo controle foi em média 0,536 vezes maior em relação ao grupo tratado entre 3 e 21 dias e 0,138 vezes menor aos 30 dias. O padrão de expressão para as bandas de 37 KDa foi similar para ambos os grupos, sendo que, entre 3 e 14 dias no grupo controle foi 1,071 vezes maior e entre 21 e 30 dias a expressão protéica foi 0,205 vezes menor no grupo controle em relação ao tratado.
-

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Em procedimentos odontológicos que envolvem um maior grau de traumatismo tecidual tais como, exodontia de inclusos, cirurgias perirradiculares, cirurgias para colocação de implantes dentários, etc., com expectativa de ocorrência de dor intensa, edema e limitação funcional faz-se necessário o uso de drogas com ação analgésica, antipirética e anti-inflamatória, na tentativa de propiciar um período pós-operatório de melhor qualidade aos pacientes. Neste contexto, os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) inibidores específicos da enzima ciclooxigenase (COX) são as drogas de primeira escolha (SAVAGE, MG, HENRY, MA, 2004; HARGREAVES, K, ABBOTT, PV, 2005).

Porém, estudos em animais com a utilização dos AINES após procedimentos cirúrgicos envolvendo osso tem demonstrado resultados controversos, alguns mostrando comprometimento do processo de reparação óssea (HARDER e AN; 2003; SEIDENBERG e AN; 2004; ALTMAN *et al.*; 1995; TURNER e BURR; 1993; LEONELLI *et al.*; 2006; ENDO *et al.*; 2002; SIMON *et al.*; 2002; GOODMAN *et al.*; 2002; GOODMAN *et al.*; 2005; SIMON *et al.*; 1999; YUGOSHI *et al.*; 2002; SIMON e MANIGRASSO, 2002; BERGENSTOCK, MIN *et al.*, 2005; MURNAGHAN, LI *et al.*, 2006; GERSTENFELD, AL-GHAWAS *et al.*, 2007; SIMON e O'CONNOR, 2007; DIMMEN, NORDSLETTEN *et al.*, 2008), enquanto que outros, ao contrário, um menor ou nenhum comprometimento (BROWN *et al.*, 2004; MULLIS *et al.*, 2002; GERSTENFELD *et al.*, 2003; LUND *et al.*, 1985; KARACHALIOS *et al.*; 2007; REUBEN e EKMAN; 2005; REUBEN e ABLETT; 2005). Uma avaliação mais profunda desses estudos sugere que inúmeras variáveis como dose, tempo de administração da droga e tipo de reparo ósseo podem ter influenciado diretamente na diferença dos resultados obtidos. Portanto, a maioria desses trabalhos experimentais não reflete o cenário clínico comum de pacientes que recebem baixas doses de um agente anti-inflamatório por um curto período de tempo. Além disso, FRACON *et al.*, (2008) salienta que os efeitos adversos dos AINES sobre o reparo ósseo foram confirmados por numerosas pesquisas experimentais e clínicas na área ortopédica, mas trabalhos relatando os efeitos adversos dos AINES sobre o reparo ósseo alveolar, que possam inspirar cuidados e/ou contraindicar seu uso na clínica

odontológica, são muito escassos. A Tabela 11 mostra a variabilidade de trabalhos que utilizaram animais como modelo experimental e as diferentes respostas obtidas com a utilização de diversos AINES.

Tabela 11 - Variabilidade de trabalhos que utilizaram animais como modelo experimental e as diferentes respostas obtidas com a utilização de diversos AINES. (Continua...)

AINE	Animal/Sexo/Idade/Peso	Modelo Experimental	Dose (mg/kg/dia)	Período de administração do AINE	Tipo de avaliação	Períodos Experimentais	Interferência sobre reparo	Autor/ano
Indometacina	Ratos/Machos	Fratura no fêmur	2	Durante todo o delineamento experimental	Radiográfico, histológico e mecânico	7, 10 e 24 dias	SIM	Bo et al., 1976
Indometacina	Ratos/Machos/ 45 dias	Fratura na ulna e no radio	1, 2 e 4	21 dias	Histológico	8, 14 e 21 dias	SIM	Allen, 1980
Ibuprofeno	Ratos/Machos/ 440-500g	Fratura na tibia	30	7 dias antes da cirurgia e 5 dias depois da cirurgia (Tt=12 dias de tratamento)	Histológico e mecânico	1,3,5,7 e 9 semanas	SIM	Lindholm et al., 1981
Celecoxibe	Ratos/Machos/ 6-9 semanas/ 580g	Fratura no fêmur	4	Diariamente até o final dos períodos experimentais	Radiográfico, histológico e mecânico	4, 6 e 8 semanas	SIM	Simon et al., 2002
Tenoxicam	Ratos/Machos/ 100g	Fratura na tibia	20	G1 e G3 - do dia da fratura até o ultimo período experimental G2 - 7 dias antes da fratura G4 - 2 dias depois da fratura	Histomorfométrico	3, 7, 14 e 28 dias	SIM	Giordano et al., 2003
Parecoxibe (Pc) Cetorolac (CL)	Ratos/Machos/ 450g	Fratura no fêmur	10 (Pc) 15(CL)	Durante todo o delineamento experimental	Histológico, mecânico e PCR (mRNA COX-1 e COX-2)	1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 35 e 42 dias	SIM	Gerstenfeld et al., 2003
Diclofenaco	Ratos/Machos/ 250-300g	Fratura na tibia	5	7 dias	Radiográfico e Histológico	3 semanas	SIM	Beck et al., 2003
Indometacina (IN) Celecoxibe (CC)	Ratos/Machos	Fratura no fêmur	1 (IN) 3 (CC)	4 semanas	Histológico e mecânico	4, 8 e 20 semanas	SIM (Histo) NÃO (Mecânico)	Brown et al., 2004
Meloxicam	Ratos/Machos	Fratura na calvária (4mm)	3	15 e 45 dias	Histológico	15 e 45 dias	SIM	Gurgel et al., 2005
Celecoxibe	Ratos/Fêmeas	Fratura no fêmur	2 e 4	Durante todo o delineamento experimental	Radiográfico, mecânico e dosagem no sangue PGE2 e PGF2	7, 14 e 21 dias	SIM	Simon et al., 2007
DFU	Ratos/Machos/ 298g	Fratura na tibia	2	7 dias	Histomorfométrico	2, 3, 4 e 5 semanas	NÃO	Gregory, 2007
Meloxicam	Coelhos/ Machos/ 3 meses/ 3,5kg	Osteotomia na ulna	0,3	5 dias	Radiográfico e histológico	6 semanas	SIM	Karachalios et al., 2007
Paracetamol Cetorolac Etoricoxibe	Ratos/machos/ 250g	Extração do incisivo	80 4 10	2 semanas	Histológico	2 semanas	NÃO	Fracon et al., 2007
Celecoxibe Cetoprofeno	Ratos/ machos/ 8 semanas/ 250g	Defeito com broca na tibia	1	1h antes da cirurgia e após 3 dias (12/12h)	Histomorfométrico e IHC-P para COX2	2, 7, 14 e 21 dias	NÃO	Matsumoto et al., 2008
Parecoxibe	Ratos/Machos/ 12 semanas/ 250-350g	Fratura no fêmur	1,06	7 dias	Radiográfico	28 e 42 dias	NÃO	Akritopoulou et al., 2008
Parecoxibe	Ratos/Fêmeas/ 226,5g	Fratura na tibia	0,625	7 dias	Radiográfico e histológico	3 semanas	SIM	Dimmen et al., 2009

Tabela 11 - Variabilidade de trabalhos que utilizaram animais como modelo experimental e as diferentes respostas obtidas com a utilização de diversos AINES. (*Continuação...*)

AINE	Animal/Sexo/Idade/Peso	Modelo Experimental	Dose (mg/kg/dia)	Período de administração do AINE	Tipo de avaliação	Períodos Experimentais	Interferência sobre reparo	Autor/ano
Rofecoxibe (RO)/Ibuprofeno (IB)	Coelhos/Machos	Osteotomia na fíbula	12,5 (RO) 50 (IB)	28 dias	Histológico, mecânico e dosagem do AINE no plasma (HPLC)	3, 6 e 12 semanas	Sim (Ro > IB)	O'Connor et al., 2009
Celecoxibe	Ratos/Machos/100g	Doença Periodontal	10 e 20	Durante todo o delineamento experimental	Radiográfico e histológico	5, 18 e 20 dias	SIM	Holzhausen et al., 2009.
Parecoxibe	Ratos/Machos	Fratura	1	7 dias	Análise mecânica e do plasma sanguíneo	30 dias	NÃO	Utvag et al., 2010
Celecoxibe	Ratos/Fêmeas/250-300g	Fratura no fêmur	4	Durante todo o delineamento experimental	Radiográfico, histológico e mecânico	5 semanas	SIM	Katoh et al., 2010
Nimesulida	Ratos/Machos	Extração do incisivo	5	2 semanas	Histológico	2 semanas	NÃO	Teófilo et al., 2011

Assim, no presente estudo, optou-se por avaliar os efeitos do uso de um AINE por um curto período de tempo de administração, na formação óssea alveolar após a exodontia dentária em ratos.

A escolha do rato deveu-se ao fato do processo de reparo ósseo alveolar nesse animal estar amplamente descrito na literatura (MAGALHÃES, OKAMOTO *et al.*, 1982; OKAMOTO *et al.*, 1994; FRACON, TEÓFILO *et al.*, 2008; OLIVEIRA, SAKAI *et al.*, 2008; TEÓFILO, GIOVANINI *et al.*, 2011), além de ser um excelente modelo para o estudo de vários aspectos da reparação óssea por exibir sequência evolutiva similar a observada em humanos (AMLER, 1969; DOTTO, MAYO *ET AL.*, 1970; OKAMOTO E DE RUSSO, 1973; EVIAN, ROSENBERG *et al.*, 1982; CARVALHO, OKAMOTO *et al.*, 1983; OKAMOTO e FIALHO, 1990).

O AINE escolhido para este trabalho foi o Meloxicam por ser amplamente prescrito na clínica odontológica. O Meloxicam é um AINE “preferencial” para COX-2 que exibe afinidade 10 vezes maior pela isoforma COX-2 (PATRIGNANI *et al.*, 1997) e cujo perfil farmacocinético em ratos assemelha-se a aquele em humanos (BUSCH *et al.*, 1996). Assim, sabe-se que em ambas as espécies, o Meloxicam se liga às proteínas plasmáticas numa taxa de 99,5-99,7%, sua meia-vida é bastante longa ao redor de 16 horas quando comparada com outros AINES convencionais, o que permite a sua utilização em dose diária única, o pico de concentração plasmática

ocorre entre 12-14 horas após a sua administração e o seu equilíbrio (steady-state) é atingido no 5º dia de administração diária.

Nossos resultados morfométricos mostraram que a aplicação diária de Meloxicam por um período curto de sete dias pós-operatório atrasa o processo inicial de reparo ósseo alveolar em ratos por promover uma reabsorção mais lenta do coágulo sanguíneo e consequentemente uma menor formação / reabsorção / remodelação óssea, corroborando com os resultados de outros trabalhos utilizando diferentes AINES por longos períodos de tempo no processo de reparo ósseo em fêmur e tíbia de ratos (SIMON *et al.*, 2002; GERSTENFELD *et al.*, 2003; BERGENSTOCK *et al.*, 2005; MURNAGHAN *et al.*, 2006; GERSTENFELD *et al.*, 2007; DIMMEN *et al.*, 2008), e em alvéolos de ratos tratados com diclofenaco por um curto período de tempo (YUGOSHI *et al.*, 2002).

O atraso no grupo tratado com Meloxicam na reabsorção do coágulo sanguíneo, que preenche quase que a totalidade do alvéolo logo após a extração dentária, parece ser um dos fatores relevantes para uma menor velocidade no reparo alveolar nesse grupo em relação ao controle. Vale a pena salientar que, o coágulo sanguíneo é fundamental nos estágios iniciais do reparo alveolar, não somente pela formação da rede de fibrina que serve de arcabouço para a invasão celular, mas também por conter grande quantidade de plaquetas responsáveis pela liberação de fatores de crescimento no local que estimulam a proliferação e a migração de células endoteliais e fibroblastos, além de macrófagos responsáveis pela reabsorção do coágulo, oriundos dos remanescentes do ligamento periodontal e dos tecidos circunjacentes. Assim, o coágulo sanguíneo é gradativamente substituído por um tecido de granulação constituído por uma delicada matriz colagenosa ricamente celularizada que favorece a migração, para o seu interior, de células osteoprogenitoras advindas de restos do ligamento periodontal (LIN *et al.*, 1995) e/ou do tecido ósseo das paredes alveolares (DEVLIN, 2000), que posteriormente diferenciam-se em osteoblastos responsáveis pela neoformação óssea.

Nesse sentido, modelos experimentais de inflamação aguda induzida por carragenina em ratos utilizando os anti-inflamatórios indometacina e dexametasona mostraram que a inibição da COX-2 interfere significativamente na angiogênese

(GHOSH *et al.*, 2000) e na transmigração de células inflamatórias responsáveis pela degradação do coágulo retardando/diminuindo a formação do tecido de granulação e consequentemente do tecido conjuntivo/ósseo. XIE *et al.* (2009) utilizando análise quantitativa por microCT mostraram ocorrência de uma acentuada redução na angiogênese durante o processo de reparação de fratura em animais nocautes para COX2-/-, associado a uma redução na expressão de MMP-9, desencadeando um acentuado atraso no processo de reparo ósseo pela via endocondral; e ainda que a administração diária do agonista do EP4 melhorava marcadamente em 70% a angiogênese nos animais nocautes e a associação concomitante dos agonistas PGE2/EP4 estimulava também a expressão da MMP-9, necessária para a invasão vascular durante a ossificação endocondral, restaurando a capacidade de formação óssea plena aos 14 dias pós-fratura. Murnaghan *et al.* (2006), também observaram esse efeito negativo do uso de AINE inibidor da COX-2 no fluxo sanguíneo e consequentemente no reparo de fraturas em camundongos, aconselhando precaução quanto ao seu uso em lesões onde a vascularização é tênue ou está muito comprometida.

Em consonância com esses trabalhos acima relatados, Arantes (2011), em sua dissertação de mestrado desenvolvida conjuntamente com a atual pesquisa avaliou a participação do VEGF, e seus receptores, na formação óssea alveolar em ratos tratados ou não com Meloxicam, verificando morfometricamente que o percentual de formação óssea era proporcional ao da reabsorção do coágulo, assim, a densidade de volume do tecido ósseo ou fração de volume tecidual ocupada pelo tecido ósseo (%TO) no grupo controle foi 0,255, 0,368, 0,409 e 0,453 vezes maior em relação ao grupo experimental nos períodos de 7, 10, 14 e 21 dias pós-exodontia, respectivamente, enquanto que a densidade de volume de coágulo sanguíneo (%Coa) foi 0,097, 0,611, 1,189 e 1,497 vezes menor em relação ao grupo tratado com Meloxicam, e a porcentagem do tecido conjuntivo não apresentou diferenças estatisticamente significantes. Neste caso, a expressão protéica do VEGF obtida por WB no grupo controle foi 0,365; 1,056; 2,187 e 0,350 vezes maior nos períodos de 3, 7, 10 e 14 dias em relação ao grupo tratado.

Convém salientar que os dados morfométricos de densidade de volume utilizados no atual trabalho, que são dados de natureza relativa, foram todos transformados em valores absolutos. Utilizando o método de reconstrução 3D de

Cavalieri, o volume absoluto do alvéolo em todos os períodos experimentais foi obtido, permitindo posteriormente a transformação dos valores percentuais de densidade de volume de tecido ósseo em valores de volume absoluto no alvéolo. Primeiramente foi verificado que o volume total do alvéolo no grupo controle manteve-se constante entre 3 e 14 dias, com volume médio de $31,37 \text{ mm}^3$, enquanto que, no grupo tratado com Meloxicam este volume permaneceu constante até os 21 dias, com volume médio de $31,38 \text{ mm}^3$, sendo que, aos 21 dias o volume do alvéolo no grupo controle foi 23,6% menor em relação ao dos animais tratados, indicando que o anti-inflamatório possa ter inibido também a reabsorção óssea necessária ao processo de formação/remodelação óssea alveolar. Outros estudos utilizando inibidores específicos da COX-2, na progressão da doença periodontal em ratos (HOLZHAUSEN *et al.*, 2002; AZOUBEL *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008) e em ratas ovariectomizadas (GREGORY *et al.*, 2007) também mostraram diminuição de perda óssea correlacionada com a redução da atividade osteoclástica.

A reabsorção óssea induzida pela IL-1 e IL-6 também ocorre via estimulação da COX-2 dependente de PGE2, produzida pelas células osteoblásticas, levando ao aumento da osteoclastogênese *in vitro* (SATO *et al.*, 1996; TAI *et al.*, 1997). Vale a pena salientar que, a PGE2 administrada de forma exógena é um forte estimulador da reabsorção óssea, em sistemas *in vitro* de cultura de órgãos, e da diferenciação osteoclástica em cultura com células da medula óssea (CHOUDHARY *et al.*, 2008). Em cultura de células da medula óssea de camundongos KO para COX-2 ou tratados com inibidores seletivos para COX-2, quando submetidos a administração exógena de COX-2 induzem a produção de PGE2 e a subsequente diferenciação de osteoclastos por inúmeros agonistas da reabsorção como LPS, citocinas pró-inflamatórias (IL-1, TNF- α), hormônios (PTH e Vitamina D3) e fatores de crescimento (FGF- β). O maior efeito da PGE2 na reabsorção óssea ocorre indiretamente via hiper-regulação da expressão do RANKL e da inibição da OPG através da via de sinalização EP4-AMPc nos osteoblastos e potencializada pela ativação do EP2 (MIYAURA *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2002; SAKUMA *et al.*, 2004).

A análise dos volumes de osso neoformado em termos absolutos ilustra todo o dinamismo do processo de reparo alveolar e da concomitante formação/remodelação. Assim, quando se avalia apenas a densidade de volume, ou seja, o percentual de tecido ósseo neoformado no interior do alvéolo, observa-se

diferenças significativas entre os grupos no intervalo de 3 e 21 dias, decorrente da maior substituição do coágulo/tecido conjuntivo por tecido ósseo. Em termos absolutos, no entanto, verificou-se que houve acúmulo real de tecido ósseo neoformado em ambos os grupos, sendo maior no grupo controle, nos períodos de 3 e 14 dias. Os resultados mostram claramente que a aplicação por 7 dias do Meloxicam provocou uma diminuição na velocidade de formação óssea levando a um atraso no reparo em relação ao controle. Contrariamente aos resultados aqui obtidos, FRACON *et al.* (2010) utilizando os anti-inflamatórios Cetorolac e Eterocoxibe e TEÓFILO *et al.* (2011) utilizando o Nimesulida, ambos por 14 dias após extração dentária, e MATSUMOTO *et al.* (2008) utilizando Celecoxibe e Ketoprofeno por 3 dias em defeitos na tíbia, concluíram que esses AINES não interferem diretamente no processo de reparo ósseo em ratos.

Por outro lado, a interferência dos AINES no processo de reparo ósseo também poderia ser explicada pela inibição da síntese das PGs pelo bloqueio da COX, que são substâncias muito importantes no estímulo da osteogênese natural durante a ossificação endocondral e intramembranosa e na reparação óssea (ZHANG *et al.*, 2002). Os estudos revelam que as PGs podem interferir diretamente no reparo de fraturas em modelos animais, estimulando a formação óssea e consequentemente o processo de reparo. Para ZHANG *et al.* (2002) as PGs participam do recrutamento e da diferenciação dos osteoblastos e ainda induzem a expressão dos genes RUNX-2 e Osterix, dois genes necessários para a formação óssea e também essenciais para diferenciação dos osteoblastos.

Convém salientar, que no presente trabalho elegeu-se a proteína RUNX-2 como marcador específico de células da linhagem osteoblástica. O RUNX-2 é um fator de transcrição envolvido na regulação de genes específicos da osteoblastogênese, controlando, por exemplo, a produção de marcadores específicos ligados a osteoblastogênese como osteocalcina, colágeno tipo I e II, osteopontina e sialoproteína óssea (DUCY *et al.*, 1997; KOMORI *et al.*, 1997); sendo um fator essencial na diferenciação de osteoblastos, visto que alguns estudos demonstraram que camundongos *knockout* para RUNX-2 são incapazes de produzir células osteoblásticas (DUCY *et al.*, 1997; KOMORI *et al.*, 1997). No entanto, ressalta-se que esse fator de transcrição não é exclusivo de células osteoblásticas, visto que a sua expressão foi relatada também em linhagem de células T do timo,

condrócitos, fibroblastos e outros tipos celulares (OGAWA *et al.*, 1993; SATAKE *et al.*, 1995; OTTO *et al.*, 1997; KOMORI *et al.*, 1997).

Na avaliação imunoistoquímica para RUNX-2 aqui realizada, verificou-se que sua expressão foi marcante em osteoblastos ativos e nos osteócitos recém-aprisionados na matriz óssea e menos expressiva em células tipo fibroblastos e algumas células endoteliais localizadas no tecido de granulação, presentes na primeira semana de reparo ou no tecido conjuntivo próximo ao tecido ósseo em formação.

O número de células imunomarcadas para RUNX-2 por mm² de alvéolo foi marcadamente maior no grupo controle em relação ao tratado com Meloxicam durante todo período experimental, enquanto que, a sua expressão protéica total por WB foi maior somente entre 3 e 14 dias. Embora o volume de tecido ósseo neoformado tenha sido similar entre os dois grupos aos 21 e 30 dias, os estágios de maturação eram diferentes, sempre mais atrasados no grupo tratado, o que pode ter ocasionado as diferenças de resultados entre as duas técnicas aqui utilizadas. Assim, histologicamente neste período, os alvéolos do grupo controle encontravam-se preenchidos por tecido ósseo já em fase de intensa remodelação e organização do tecido ósseo secundário ou lamelar, com nítida formação dos espaços medulares, enquanto no grupo tratado com Meloxicam o tecido era mais imaturo praticamente sem nenhum indício de formação dos espaços medulares.

Um outro fato que também vale à pena ressaltar é que outros fatores podem estar envolvidos nesse processo, assim estudo *in vitro* com células tronco mesenquimais humanas mostrou que a inibição indireta da síntese de PGE₂, por NS-398, um inibidor seletivo da COX-2, suprime a expressão de BMP-2 e consequentemente a diferenciação osteoblástica (ARIKAWA *et al.* 2004) suportando a possibilidade de que os eventos associados às BMPs possam ser dependentes de metabólitos da COX (ZHANG *et al.*, 2002). WELTING *et al.* (2011) também ressaltam esta inter-relação entre a COX-2 e a BMP-2 durante a diferenciação de condrócitos hipertróficos mediada pela BMP-2, utilizando Celecoxibe. Desta forma, de acordo com os mecanismos discutidos, a COX-2 regula fatores de transcrição associados à osteogênese e controla a diferenciação osteoblástica, logo, a redução

na osteoblastogênese parece ser um fator a mais para explicar os efeitos prejudiciais dos AINES seletivos para COX-2 sobre o metabolismo ósseo.

DEKEL *et al.* (1981) mostrou que os maiores níveis de PGE e PGF foram encontrados entre os dias 3 e 14 de reparo de fraturas em tíbias de ratos, submetidos ao tratamento com um anti-inflamatório seletivo para COX-2 durante 15 dias. De acordo com os esses autores, a expressão do RNAm da COX-2 e de seus metabólitos também foi mais elevada durante as fases iniciais do reparo. GERSTENFELD *et al.* (2003) também demonstraram que durante os primeiros 21 dias do reparo ósseo, os níveis de RNAm da COX-1 permanecem constantes, enquanto os níveis de RNAm da COX-2 apresentam picos de elevação durante os primeiros 14 dias de reparo, e posteriormente retornam ao nível basal após 21 dias. Esse perfil de expressão da COX-2 também foi aqui verificado durante o reparo ósseo alveolar, tanto no grupo controle como no tratado, com aumento gradativo no número de células imunomarcadas para a COX-2 nos períodos iniciais atingindo um pico entre 3 e 7 dias e decaindo continuamente até os 30 dias. Esses achados indicam que nas primeiras semanas da reparação óssea, a atividade osteogênica é mais intensa devido às elevadas taxas de transcrição da COX-2 e, conseqüentemente, em decorrência dos altos níveis de PGs encontrados nestes períodos, uma vez que estes metabólitos estimulam a formação óssea (WEINREB *et al.*, 1997; SUPONITZKY *et al.*, 1998).

Vários tipos celulares tais como, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais e células inflamatórias, expressaram esta proteína, em ambos os grupos. Com relação ao tratamento com Meloxicam, não houve diferenças em relação ao controle nos diferentes períodos analisados, exceto aos 30 dias, indicando que a administração da droga não interfere no número de células positivas para COX-2. Essa ausência de diferenças na expressão da COX-2 foi também observado por YOON *et al.* (2010) durante a análise da diferenciação osteogênica em cultura de células tronco mesenquimais (MSCs) utilizando como inibidores os anti-inflamatórios Celecoxibe e o Naproxeno, e por Matsumoto *et al.* (2008) no reparo de defeito ósseo na tíbia de ratos utilizando Celecoxibe e Cetoprofeno. Porém, no atual trabalho verificou-se que, a expressão protéica da COX-2 por WB foi 0,739 vezes menor no grupo tratado entre 3 e 14 dias. Neste caso, pode-se inferir que, embora o número de células imunomarcadas para COX-2 fosse similar entre os grupos/período, a

intensidade de expressão da proteína pelas células é diferente e dependente do tipo celular, variando durante as diferentes fases de reparo entre os grupos.

Dentro dos limites da atual pesquisa e diante dos resultados aqui apresentados e discutidos é possível inferir que o Meloxicam usado por um período curto de tratamento no início do pós-operatório promove um atraso no processo de reparação óssea nos períodos iniciais, decorrente da inibição parcial da transmigração de células inflamatórias responsáveis pela degradação do coágulo e da angiogênese, ocasionando temporariamente um retardo na formação dos tecidos de granulação/conjuntivo, diferenciação de células osteoblásticas e formação óssea, atraso esse recuperado em termos quantitativos nos períodos finais analisados, não provocando mais nenhuma modificação significativa no processo de cura do alvéolo passível de contraindicar o seu uso terapêutico na clínica odontológica.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A análise dos resultados aqui obtidos permitem concluir que a aplicação diária do Meloxicam por 7 dias, para tratamento da dor pós-exodontia em ratos provoca um atraso nos períodos iniciais, na reabsorção do coágulo sanguíneo, diferenciação das células da linhagem osteoblástica e consequentemente na formação/remodelação óssea ocasionando um retardo temporário no processo de reparo ósseo alveolar, que é recuperado nos períodos subsequentes.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AKHTER, M.P; CULLEN, D.M; GONG, G; RECKER, R.R. Bone biomechanical properties in prostaglandin EP1 and EP2 knockout mice. **Bone**. Aug; 29(2): 121-5, 2001.

AKRITOPOULOS, P; PAPAIOANNIDOU, P; HATZOKOS, I; HARITANTI, A; IOSIFIDOU, E; KOTOULA, M; MIRTOSOU-FIDANI, V. Parecoxib has non-significant long-term effects on bone healing in rats when administered for a short period after fracture. **Arch Orthop Trauma Surg**. Oct;129(10):1427-32, 2009.

ALTMAN, R.D., LATTA, L.L., KEER, R. Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on fracture healing: a laboratory study in rats. **J Orthop Trauma**, 9, 392-400, 1995.

AMLER, M.H. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 27(3):309-318, 1969.

ARANTES, R.V.N. Estudo da angiogênese e da expressão temporal do VEGF e dos seus receptores VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/Flk-1 durante o reparo ósseo alveolar normal e com uso terapêutico de um antiinflamatório não esteroidal seletivo para COX-2 em ratos. 2011. 205 f. Dissertação de mestrado – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. 2011.

ARIKAWA, T; OMURA, K; MORITA, I. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. **J Cell Physiol**. 200:400-406, 2004.

AZOUBEL, M.C.F, MENEZES, A.M.A, BEZERRA, D, ORIÁ, R.B, RIBEIRO, R.A, BRITO, G.A.C. Comparison of etoricoxib and indomethacin for the treatment of experimental periodontitis in rats. **Braz J Med Biol Res**. 40(1):117-25, 2007.

BEEJAY, U; WOLFE, M.M. Cyclooxygenase 2 selective inhibitors: panacea or flash in the pan? **Gastroenterology**. 117(4): 1002-5, 1999.

BERGENSTOCK, M, MIN, W, SIMON, A.M, SABATINO, C, O'CONNOR, J.P. A comparison between the effects of acetaminophen and celecoxib on bone fracture healing in rats. **J Orthop Trauma**. 19, 717-723, 2005.

BEZERRA, M. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 71, n. 6, p. 1009-1014, Jun. 2000.

BLACKWELL, K.A; RAISZ, L.G; PILBEAM, C.C. Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? **Trends Endocrinol Metab**. May; 21(5):294-301, 2010.

BOTTING, R. Cox-1 and COX-3 inhibitors. **Thromb Res**. 110(5-6): 269-72, 2003.

BOURSINOS, L.A; KARACHALIOS, T; POULTSIDES, L; MALIZOS, K.N. Do steroids, conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs and selective Cox-2 inhibitors adversely affect fracture healing? **J Musculoskelet Neuronal Interact.** Jan-Mar; 9(1):44-52, 2009.

BROWN, K. M, SAUNDERS, M. M, KIRSCH, T, DONAHUE, H. J, REID, J. S. Effect of COX-2-specific inhibition on fracture-healing in the rat femur. **J Bone Joint Surg Am.** 86-A, 116–23, 2004.

BUSCH, L, WERNER, S, TESSLER, J. Inhibitory effects of diazepam in rat vas deferens: role of calcium. **Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.** 46(4):247-255, 1996.

CARVALHO, P.S, OKAMOTO, T, CARVALHO, A.C. The process of wound healing in dental extraction. Effect of intra-alveolar irrigation and curettage and irrigation. Histological study in rats. **RGO.** 31(1):19-22, 1983.

CHAN, F.K; SUNG, J.J. Therapies for ulcers associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. **N Engl J Med.** Jul 30;339(5):349-50, 1998.

CHANDRASEKHARAN, N.V; DAI, H; ROOS, K.L; EVANSON, N.K; TOMSIK, J; ELTON, T.S; SIMMONS, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 99(21): 13926-31, 2002.

CHIKAZU, D; LI, X; KAWAGUCHI, H; SAKUMA, Y; VOZNESENSKY, O.S; ADAMS, D.J; XU, M; HOSHI, K; KATAVIC, V; HERSCHMAN, H.R; RAISZ, L.G; PILBEAM, C.C. Bone morphogenetic protein 2 induces cyclo-oxygenase 2 in osteoblasts via Cbfa-1 binding site: Role in effects of bone morphogenetic protein 2 in vitro and in vivo. **J Bone Miner Res.** 17, 8, 2002.

CHOUDHARY, S, ALANDER, C, ZHAN, P, GAO, Q, PILBEAM, C, RAISZ, L. Effect of deletion of the prostaglandin EP2 receptor on the anabolic response to prostaglandin E2 and a selective EP2 receptor agonist. **Prostaglandin Other Lipid Mediat.** 86:35–40, 2008.

CLARIA, J. Cyclooxygenase-2 biology. **Curr Pharm Des.** 9(27): 2177-90, 2003.

CROFFORD, L.J. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. **J Rheumatol Suppl.** 49, 15-9, 1997.

CURTIS, E.K. Inflammatory response. **J Mass Dent Soc.** 54 (3):48, 2005.

DEKEL, S, LENTHALL, G, FRANCIS, M.J. Release of prostaglandins from bone and muscle after tibiae fracture. An experimental study in rabbits. **J Bone Joint Surg Br** 63-B(2):185-9, 1981.

DEQUEKER, J; HAWKEY, C; KAHAN, A; STEINBRÜCK, K; ALEGRE, C; BAUMELOU, E; BÉGAUD, B; ISOMÄKI, H; LITTLEJOHN, G; MAU, J; PAPAZOGLU, S. Improvement in gastrointestinal tolerability of the selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor, meloxicam, compared with piroxicam: results of the safety and efficacy large-scale evaluation of COX-inhibiting therapies (SELECT) trial in osteoarthritis. **Br J Rheumatol.** Sep 37(9):946-51, 1998.

DEVLIN, H.; SLOAN, P. Early bone healing events in the human extraction socket. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 31, n. 6, p. 641-645, Dec. 2002.

DIMMEN, S; NORDSLETTEN, L; ENGBRETSSEN, L; STEEN, H; MADSEN, J.E. Negative effect of parecoxib on bone mineral during fracture healing in rats. **Acta Orthop**. Jun; 79(3): 439-44, 2008.

DIMMEN, S; NORDSLETTEN, L; MADSEN, J.E. Parecoxib and indomethacin delay early fracture healing: a study in rats. **Clin Orthop Relat Res**. Aug; 467(8): 1992-9, 2009.

DOTTO, C.A, MAYO, J, CABRINI, R.L, ITOIZ, M.E, CARRANZA, F.A.JR. Quantitative study of vascular response in irradiated wounds. **Surg Gynecol Obstet**. 130(5):875-878, 1970.

DUBOIS, R.N; ABRAMSON, S.B; CROFFORD, L; GUPTA, R.A; SIMON, L.S; VAN DE PUTTE, L.B; LIPSKY, P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. **Faseb J**. 12(12): 1063-73, 1998.

DUCY, P, ZHANG, R, GEOFFROY, V, RIDALL, A.L, KARSENTY, G. Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. **Cell** 89:747-754, 1997.

EMERY, P. Considerations for nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy: benefits. **Scand J Rheumatol Suppl**. 105:5-9, 1996.

ENDO, K, SAIRYO, K, KOMATSUBARA, S, SASA, T, EGAWA, H, YONEKURA, D, ADACHI, K, OGAWA, T, MURAKAMI, R, YASUI, N. Cyclooxygenase-2 inhibitor inhibits the fracture healing. **J Physiol Anthropol Appl Human Sci**. 21: 235-238, 2002.

ENGELHARDT, G; HOMMA, D; SCHLEGEL, K; UTZMANN, R; SCHNITZLER, C. Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory agent with favourable gastrointestinal tolerance. **Inflamm Res**. Oct 44(10):423-33, 1995.

EVIAN, C.L, ROSENBERG, E.S, COSLET, J.G, CORN, H. The osteogenic activity of bone removed from healing extraction sockets in humans. **J Periodontol**. 53(2):81-85, 1982.

FAYE-PETERSEN, O.M; JOHNSON, WH J.R; CARLO, W.A; HEDLUND, G.L; PACIFICO, A.D; BLAIR, H.C. Prostaglandin E1-induced hyperostosis: clinicopathologic correlations and possible pathogenetic mechanisms. **Pediatr Pathol Lab Med**. May-Jun; 16(3):489-507, 1996.

FLANAGAN, A.M; CHAMBERS, T.J. Stimulation of bone nodule formation in vitro by prostaglandins E1 and E2. **Endocrinology**. Jan; 130(1):443-8, 1992.

FLEISCHMANN, R; IQBAL, I; SLOBODIN, G. Meloxicam. **Expert Opin Pharmacother**. 3(10):1501-12, 2002.

FORWOOD, M.R. Inducible cyclooxygenase (COX-2) mediates the induction of bone formation by mechanical loading in vivo. **J. Bone Miner. Res**. 11, 1688-1693, 1996.

FRACON, R.N; TEÓFILO, J.M; SANTIN, R.B; LAMANO, T. Prostaglandin and bone: potential risks and benefits related to the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in clinical dentistry. **J. Oral Science**. 50, 247-252, 2008.

FRACON, R.N, TEÓFILO, J.M, MORIS, I.C, LAMANO, T. Treatment with paracetamol, ketorolac or etoricoxib did not hinder alveolar bone healing: a histometric study in rats. **J Appl Oral Sci**. 18(6):630-634, 2010.

GERSTENFELD, L.C; THIEDE, M; SEIBRT, K; MIELKE, C; PHIPPARD, D; SVAGR, B; CULLINANE, D; EINHORN, T.A. Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **J Orthop Res**. Jul; 21(4):670-5, 2003.

GERSTENFELD, L.C, AL-GHAWAS, M, ALKHIARY, Y.M, CULLINANE, D.M, KRALL, E.A, FITCH, J.L, WEBB, E.G, THIEDE, M.A, EINHORN, T.A. Selective and nonselective cyclooxygenase-2 inhibitors and experimental fracture-healing. Reversibility of effects after short-term treatment. **J Bone Joint Surg Am**. 89(1):114-25, 2007.

GHOSH, A.K, HIRASAWA, N, NIKI, H, OHUCHI, K. Cyclooxygenase-2-mediated angiogenesis in carrageenan-induced granulation tissue in rats. **J Pharmacol Exp Ther**. 295(2), 2000.

GIERSE, J.K; D.HAUSER, S; CREELY, D.P; KOBOLDT, C; RANGWALA, S.H; ISAKSON, P.C; SEIBERT, K. Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclo-oxygenase. **Biochem J**. 305, 479-484, 1995.

GOODMAN, S; MA, T; TRINDADE, M; IKENOUE, T; MATSUURA, I,; WONG, N; FOX, N; GENOVESE, M; REGULA, D; SMITH, R.L. COX-2 selective NSAID decreases bone ingrowth in vivo. **J Orthop Res**. Nov; 20(6): 1164-9, 2002.

GOODMAN, S; MA, T; MITSUNAGA, L; MIVANISHI, K; GENOVESE, M; SMITH, R.L. Temporal effects of a COX-2 selective NSAID on bone ingrowth. **J Biomed Mater Res**. 72(3):279-287, 2005.

GREGORY, L.S, FORWOOD, M.R. Cyclooxygenase-2 inhibition delays the attainment of peak woven bone formation following four-point bending in the rat. **Calcif Tissue Int**. 80, 176-183, 2007.

HARDER, A.T; AN, Y.H. The mechanisms of the inhibitory effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on bone healing: a concise review. **J Clin Pharmacol**. Aug; 43(8): 807-15, 2003.

HARGREAVES, K, ABBOTT, P.V. Drugs for pain management in dentistry. **Aust Dent J** 50(4 Suppl 2), S14-S22, 2005.

HARGREAVES, K, ABBOTT, P.V. Drugs for pain management in dentistry. **Aust Dent J**. 50(2), 2008.

HLA, T; BISHOP-BAILEY, D; LIU, C.H; SCHAEFERS, H.J; TRIFAN, O.C. Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. **Int J Biochem Cell Biol**. 31(5): 551-7, 1999.

HOWARD, C.V; REED, M.G. Unbiased Stereology. Three-dimensional measurement in microscopy. **New York**: Springer, 246p, 1998.

HOLZHAUSEN, M, MARCANTONIO JR.E, SPOLIDORIO, D.M.P, SPOLIDORIO, L.C. Efeito do celecoxib sobre a resposta inflamatória em doença periodontal experimental – estudo histológico em ratos. **Rev Period.** 19(2), 2009.

KANEKI, H; TAKASUGI, I; FUJIEDA, M; KIRIU, M; MIZUOCHI, S; IDE, H. Prostaglandin E2 stimulates the formation of mineralized bone nodules by a cAMP-independent mechanism in the culture of adult rat calvarial osteoblasts. **J Cell Biochem.** Apr 1; 73(1): 36-48, 1999.

KARACHALIOS, T; BOURSINOS, L; POULTSIDES, L; KHALDI, L; MALIZOS, K.N. The effects of the short-term administration of low therapeutic doses of anti-COX-2 agents on the healing of fractures. An experimental study in rabbits. **J Bone Joint Surg Br.** Sep; 89(9): 1253-60, 2007.

KOBAYASHI, Y; TAKE, I; YAMASHITA, T; MIZOGUCHI, T; NIMOMIYA, T; HATTORI, T; KURIHARA, S; OZAWA, H; UDAGAWA, N; TAKAHASHI, N. Prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 are down-regulated during differentiation of mouse osteoclasts from their precursors. **J Biol Chem.** 280(25), 24, 24035-042, 2005.

KOMORI, T, YAGI, H, NOMURA, S. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblast. **Cell** 89: 755-764, 1997.

LEONELLI, S.M; GOLDBERG, B.A; SAFANDA, J; BAGWE, M.R; SETHURATNAM, S; KING, S.J. Effects of a cyclooxygenase-2 inhibitor (rofecoxib) on bone healing. **Am J Orthop.** Feb; 35(2): 79-84, 2006.

LI, X; TOMITA, M; PILBEAM, C.C; BREYER, R.M; RAISZ, L.G. Prostaglandin receptor EP2 mediates PGE2 stimulated hypercalcemia in mice in vivo. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** Apr; 67(3-4): 173-80, 2002.

LIN, C.H, JEE, W.S, MA, Y.F, SETTERBERG, R. B. Early effects of prostaglandin E2 on bone formation and resorption in different bone sites of rats. **Bone.** 17, 255S–259S, 1995.

LUND, B, STORM, T.L, LUND, B, MELSEN, F, MOSEKILDE, L, ANDERSEN R.B, EGMOSE, C, SÖRENSEN, O.H. Bone mineral loss, bone histomorphometry and vitamin D metabolism in patients with rheumatoid arthritis on long-term glucocorticoid treatment. **Clin Rheumatol.** 4:143-149, 1985.

MAGALHÃES, A. E. O. Influência da fratura da crista óssea alveolar no processo de reparo em feridas de extração dental. Estudo histológico em ratos. **Rev Ass Paul Cirurg Dent**, v. 36, n. 2, 1982

MASFERRER, J.L; ZWEIFEL, B.S; MANNING, P.T; HAUSER, S.D; LEAHY, K.M; SMITH, W.G; ISAKSON, P.C; SEIBERT, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic. **Proc Natl Acad Sci.** Apr; 91(8):3228-32, 1994.

MATSUMOTO, M.A; DE OLIVEIRA, A; RIBEIRO JUNIOR, P.D; NARY FILHO, H; RIBEIRO, DA. Short-term administration of non-selective and selective COX-2 NSAIDs do not interfere with bone repair in rats. **J Mol Histol.** Aug; 39(4):381-7, 2008.

MATTIA, C; COLUZZI, F. COX-2 inhibitors: pharmacological data and adverse effects. **Minerva Anesthesiol.** 71(7-8): 461-70, 2005.

MELNIKOVA, I. Future of COX-2 inhibitors. **Nat Rev Drug Discov.** Jun; 4(6):453-4, 2005.

MINAMIZAKI, T; YOSHIKO, Y; KOZAI, K; AUBIN, J.E; MAEDA, N. EP2 and EP4 receptors differentially mediate MAPK pathways underlying anabolic actions of prostaglandin E2 on bone formation in rat calvaria cell cultures. **Bone.** Jun; 44(6): 1177-85, 2009.

MIYAUCHI, M; HIRAOKA, M; OKA, H; SATO, S; KUDO, Y; OGAWA, I; NOGUCHI, K; ISHIKAWA, I; TAKATA, T. Immuno-localization of COX-1 and COX-2 in the rat molar periodontal tissue after topical application of lipopolysaccharide. **Arch Oral Biol.** 49(9): 739-46, 2004.

MIYAURA, C, INADA, M, SUZAWA, T. Impaired bone resorption to prostaglandin E2 in prostaglandin E receptor EP4-knockout mice. **J Biol Chem.** 275,19819-19823, 2000.

MONTJOVENT, MO; BURRI, N; MARK, S; FEDERICI, E; SCALETTA, C; ZAMBELLI, PY; HOHLFELD, P; LEYVRAZ, PF; APPELGATE, LL; PIOLETTI, DP. Fetal bone cells for tissue engineering. **Bone.** 35:1323-1333, 2004.

MULLIS, B.H; COPELAND, S.T; WEINHOLD, P.S; MICLAU, T; LESTER, G.E; BOS, G.D. Effect of COX-2 inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs on a mouse fracture model. **Injury.** Sep; 37(9): 827-37, 2006.

MURNAGHAN, M; LI, G; MARSH, D.R. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced fracture nonunion: an inhibition of angiogenesis? **J Bone Joint Surg Am.** Nov;88 Suppl 3:140-7, 2006.

NAGATA, T; KAHO, K; NISHIKAWA, S; SHINOHARA, H; WAKANO, Y; ISHIDA, H. Effect of prostaglandin E2 on mineralization of bone nodules formed by fetal rat calvarial cells. **Calcif Tissue Int.** Dec; 55(6):451-7, 1994.

NOBLE, S; BALFOUR, J.A. Meloxicam. **Drugs.** Mar; 51(3):424-30, 1996.

NORRIN, R.W; SHIH, M.S. Systemic effects of prostaglandin E2 on vertebral trabecular remodeling in beagles used in a healing study. **Calcif Tissue Int.** Jun; 42(6):363-8, 1988.

O'BANION, M.K. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology and neurobiology. **Crit Rev Neurobiol.** 13(1):45-82, 1999.

O'CONNOR, J.P; LYZZS, T. Celecoxib, NSAIDs and the skeleton. **Drugs Today (Barc).** Sep; 44(9):693-709, 2008.

O'CONNOR, J.P.B; CLAMP, A.R; ROSS, J; HO, C.K; PARKER, G.J.P; JACKSON, A; MITCHELL, C.L; ET AL. Quantifying anti-vascular effects of anti-VEGF monoclonal antibodies to vascular endothelial growth factor: Insights from imaging. **Clinical Cancer Research**, 15, 6674-6682, 2009.

OGAWA, E, MARUYAMA, M, KAGOSHIMA, H, INUZUKA, M, LU, J, SATAKE, M, SHIGESADA, K, ITO, Y. PEBP2/PEA2 represents a new family of transcription factor homologous to the products of the *Drosophila runt* and the human AML1 gene. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 90, 6859-6863, 1993.

OKADA, Y; LORENZO, J.A; FREEMAN, A.M; TOMITA, M; MORHAM, S.G; RAISZ, L.G; PILBEAM, C.C. Prostaglandin G/H synthase-2 is required for maximal formation of osteoclast-like cells in culture. **J Clin Invest**. Mar;105(6):823-32. 2000.

OKAMOTO, T, GABRIELLI, M.F. Reimplantation of the molar in rats. Influence of immobilization of the reimplanted tooth in the occurrence of postoperative complications. **Rev Assoc Paul Cir Dent**. 35(4):302, 1982.

OKAMOTO, T; DE RUSSO, M.C. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. **Rev Fac Odontol**. v.2, n.2, p.153-69, Araçatuba, 1973.

OKAMOTO, T, VASCONCELOS FIALHO, A.C. Comparative histological study of two methods of obtaining alveolar sections in rats. **Rev Odontol UNESP**. 19(1):63-74, 1990.

OKAMOTO, T.M et al. Processo de Reparação Óssea após Osteotomia com Instrumentos Rotatórios de Alta Rotação. Estudo Histológico em Cães após Emprego de Dois Tipos de Broca com e sem Resfriamento. **Rev Bras Odontol**, v. 51, n. 1, p. 21-25, 1994.

OLIVEIRA, T. M, SAKAI, V.T, MACHADO, M.A, DIONISIO, T.J, CESTARI, T.M, AMARAL, S.L, SANTOS, C.F. COX-2 inhibition decreases VEGF expression and alveolar bone loss during the progression of experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 79, n. 6, p. 1062-1069, Jun. 2008.

O'NEIL, G.P., FORD-HUTCHINSON, A.W.Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. **FEBS Lett**. 330: 156-160, 1993.

OTTO, F, THORNELL, A. P, CROMPTON, T, DENZEL, A, GILMOUR, K. C, ROSEWELL, I. R, STAMP, G. W. H, BEDDINGTON, R. S. P, MUNDLOS, S, OLSEN, B. R. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. **Cell** 89, 765-771, 1997.

PATRIGNANI, P, PANARA, M.R, SCIULLI, M.G, SANTINI, G, RENDA, G, PATRONO, C. Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **J Physiol Pharmacol**. 48(4):623-631, 1997.

PENNING, T.D; TALLEY, J.J; BERTENSHAW, S.R; CARTER, J.S; COLLINS, P.W; DOCTER, S; GRANETO, M.J; LEE, L.F; MALECHA, J.W; MIYASHIRO, J.M; ROGERS, R.S; ROGIER, D.J; YU, S.S; ANDERSON, G.D; BURTON, E.G; COGBURN, J.N; GREGORY, S.A; KOBOLDT, C.M; PERKINS, W.E; SEIBERT, K; VEENHUIZEN, A.W; ZHANG, Y.Y; ISAKSON, P.C. Synthesis and Biological Evaluation of the 1,5-Diarylpyrazole Class of

Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Identification of 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, Celecoxib). **J Med Chem.** 40, 1347-1365, 1997.

RADI, Z.A; KHAN, N.K. Effects of cyclooxygenase inhibition on bone, tendon, and ligament healing. **Inflamm Res.** Sep;54(9):358-66, 2005.

REUBEN, S.S, ABLETT, D, KAYE, R. High dose nonsteroidal anti-inflammatory drugs compromise spinal fusion. **Can J Anaesth.** 52:506-512, 2005.

REUBEN, S.S, EKMAN, E.F. The effect of cyclooxygenase-2 inhibition on analgesia and spinal fusion. **J Bone Joint Surg Am.** 87:536-542, 2005.

RIENDEAU, D; CHARLESON, S; CROMLISH, W; MANCINI, J.A; WONG, E; GUAY, J. Comparison of the cyclooxygenase-1 inhibitory properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and selective COX-2 inhibitors, using sensitive microsomal and platelet assays. **Can J Physiol Pharmacol.** Sep;75(9):1088-95, 1997.

SAKUMA, Y, TANAKA, K SUDA, M. Crucial involvement of the EP4 subtype of prostaglandin E receptor in osteoclast formation by proinflammatory cytokines and lipopolysaccharide. **J Bone Min Res.** 15,218-227, 2000.

SALARI, P; ABDOLLAHI, M. Controversial effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on bone: a review. **Inflamm Allergy Drug Targets.** Jul; 8(3): 169-75, 2009

SALVI, G.E; YALDA, B; COLLINS, J.G; JONES, B.H; SMITH, F.W; ARNOLD, R.R; OFFENBACHER, S. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontaldiseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. **J Periodontol,** 68:127-135, 1997.

SATAKE, M, NOMURA, S, YAMAGUCHI-IWAI, Y, TAKAHAMA, Y, HASHIMOTO, Y, NIKI, M, KITAMURA, Y, ITO, Y. Expression of the Runt domain-encoding PEBP2 alpha genes in T cells during thymic development. **Mol Cell Biol.** 15:1662–1670, 1995.

SATO, T; MORITA, I; MUROTA, S. Prostaglandin E2 mediates parathyroid hormone induced osteoclast formation by cyclic AMP independent mechanism. **Adv Exp Med Biol.** 407:383-6, 1997.

SAVAGE, M.G., HENRY, M.A. Preoperative nonsteroidal anti-inflammatory agents: Review of the literature. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 98 (2), 2004.

SEIDENBERG, A.B., AN, Y.H. Is there an inhibitory effect of COX-2 inhibitors on bone healing? **Pharmacol Res** 50, 151-156, 2004.

SEYMOUR, R.A; HEASMAN, P.A. Drugs and the periodontium. **J Clin Periodontol.** Jan; 15(1):1-16., 1988.

SIMON, L.S, WEAVER, A.L, GRAHAM, D.Y, KIVITZ, A.J, LIPSKY, P.E, HUBBARD, R.C, ISAKSON, P.C, VERBURG, K.M, YU, S.S, ZHAO, W.W. Anti-inflammatory and upper

gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. **J Am Med Assoc.** 282:1921–1928, 1999.

SIMON, L.S, LIPMANN, A.G, CAUDILL-SLOSBERG, M. Guideline for the Management of Pain in Osteoarthritis, Rheumatoid Arthritis and Juvenile Chronic Arthritis. **Glenview USA: American Pain Society**, 2002.

SIMON, A.M, MANIGRASSO, M.B, O'CONNOR, J.P. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. **J Bone Miner Res.** 17, 963-976, 2002.

SIMON, A.M; O'CONNOR, J.P. Dose and time-dependent effects of cyclooxygenase-2 inhibition on fracture-healing. **J Bone Joint Surg Am.** Mar; 89(3): 500-11, 2007.

SCHONBECK, U; SUKHOVA, G.K; GRABER, P; COULTER, S; LIBBY, P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. **Am J pathol.** 155(4): 1281-91, 1999.

SCUTT, A; BERTRAM, P. Bone marrow cells are targets for the anabolic actions of prostaglandins E2 on bone: induction of a transition from nonadherent osteoblast precursor. **J Bone Miner Res.** Mar; 10(3):474-87, 1995.

SUPONITZKY, I, WEINREB, M. Differential effects of systemic prostaglandin E2 on bone mass in rat long bones and calvariae. **J Endocrinol.** 156(1): 51-7, 1998.

TAI, H., MIYAURA, C., PILBEAM, C.C., TAMURA, T., OHSUGI, Y., KOISHIHARA, Y., KUBODERA, N., KAWAGUSHI, H., RAISZ, L.G., SUDA, T. Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 in osteoblast is involved in interleukin-6-induced osteoclast formation. **Endocrinology.** 138, 2372-2379, 1997.

TALLEY, J.J; BROWN, D.L; CARTER, J.S; GRANETO, M.J; KOBOLDT, C.M; MASFERRER, J.L; PERKINS, W.E; ROGERS, R.S; SHAFFER, A.F; ZHANG, Y.Y; ZWEIFEL, B.S; SEIBERT, K. 4-[5-Methyl-3-phenylisoxazol-4-yl]- benzenesulfonamide, valdecoxib: a potent and selective inhibitor of COX-2. **J Med Chem.** Mar 9;43(5):775-7, 2000.

TEÓFILO, J. M. et al. Histometric study of alveolar bone healing in rats treated with the nonsteroidal anti-inflammatory drug nimesulide. **Implant Dent**, v. 20, n. 2, p.e7-13, Apr. 2011.

THIES, R.S., BAUDUY, M., ASHTON, B.A., KURTZBERG, L., WOZNEY, J.M., ROSEN, V. Recombinant human BMP-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. **Endocrinology.** 1314-1318, 1992.

TIAN, X.Y; ZHANG, Q; ZHAO, R; SETTERBERG, R.B; ZENG, Q.Q; MA, Y.F; JEE, W.S.S. Continuous infusion of PGE2 is catabolic with a negative bone balance on both cancellous and cortical bone in rats. **J Muculoskelet Neuronal Interact.** 7(4):372-381, 2007.

TURNER, C. H., BURR, D. B. Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial. **Bone**, 14, 595–608, 1993.

UEDA, K; SAITO, A; NAKANO, H; AOSHIMA, M; YOKOTA, M; MURAOKA, R; IWAYA, T. Cortical hyperostosis following long-term administration of prostaglandin E1 in infants with cyanotic congenital heart disease. **J Pediatr.** Nov; 97(5):834-6, 1980.

VANE, J.R; BAKHLE, Y.S; BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 38: 97-120, 1998.

VANE, J.R; BOTTING, R.M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. **Inflamm Res.** 47 Suppl 2 S78-87, 1998.

VUOLTEENAHO, K; MOILANEN, T; MOILANEN, E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase-2 and the bone healing process. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** Jan; 102(1): 10-4, 2008.

XIE, R, KUIJPERS-JAGTMAN, A.M, MALTHA, J.C. Osteoclast differentiation and recruitment during early stages of experimental tooth movement in rats. **Eur J Oral Sci.** 117(1):43-50, 2009.

XU, Z; CHOUDHARY, S; OKADA, Y; VOZNESENSKY, O; ALANDER, C; RAISZ, L; PILBEAM, C. Cyclooxygenase-2 gene disruption promotes proliferation of murine calvarial osteoblasts in vitro. **Bone.** v.41, 68-76, 2007.

WEIBEL, E.R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. **Int Rev Cytol.** 26:235-302, 1969.

WEINREB, M, KELNER, A, KEILA, S. Inhibition of cyclo-oxygenase-2 activity does not abolish the anabolic effect of prostaglandin E2 in vivo or in vitro. **J Endocrinol.** 174, 127-135, 2002.

WELTING, T.J.M, CARON, M.M.J, EMANS, P.J, JANSSEN, M.P.F, SANEN, K, COOLSEN, M.M.E, VOSS, L, SURTEL, D.A.M, CREMERS, A, VONCKEN, J.W, VAN RHIJN, L.W. Inhibition of cyclooxygenase-2 impacts chondrocyte hypertrophic differentiation during endochondral ossification. **Eur Cel Mat.** 22, 420-437, 2011.

YOON et al. The effects of COX-2 inhibitor during osteogenic differentiation of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. **Stem Cells Dev.** v.19, n.10, p.1523-33. Oct. 2010.

YUGOSHI, L. I, SALA, M.A, BRENTAGANI, L.G, CARVALHO, T.L.L. Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. **Braz Dent J,** 13, 2, 92-96, 2002.

ZHANG, X; SCHWARZ, E.M; YOUNG, D.A; PUZAS, E; ROSIER, R.N; O'KEEFE, R.J. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. **J. Clin. Invest.** 109: 1405-1415, 2002.

ZHANG, Z.H; WEI, S.G; FRANCIS, J; FELDER, R.B. Cardiovascular and renal sympathetic activation by blood-borne TNF-alpha in rat: the role of central prostaglandins. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 284(4): R916-27, 2003.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
Fone: (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 032/2010

Bauru, 30 de março de 2011.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Diferenciação e crescimento das células osteoblásticas durante o reparo ósseo alveolar normal e com uso terapêutico de um antiinflamatório não-esteroidal seletivo para COX-2 em ratos**, de autoria Bruno Alvares Viscelli, sob sua orientação, foi aprovado "ad referendum", desta Comissão.

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. Gustavo Tempermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Rumio Taga
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO B – AUTORIZAÇÃO PARA ACRÉSCIMO DE 80 ANIMAIS EXTRAS

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
Fone: (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Of. CEEPA Nº 014/2009

Bauru, 4 de maio de 2010.

Senhor Professor,

Em atenção à solicitação de Vossa Senhoria, autorizamos o acréscimo de 80 animais para finalizar os experimentos da pesquisa intitulada *"Estudo da angiogênese e da expressão temporal da VEGF e do seu receptor VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/Flk-1 durante o reparo ósseo alveolar normal e com o uso terapêutico de um antiinflamatório não esteroide seletivo para a COX-2 em ratos"*, de autoria de Ricardo Vinícius Nunes Arantes, sob sua orientação, considerando não haver impedimentos éticos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Rumio Taga

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO C – APROVAÇÃO DA ALTERAÇÃO DO TÍTULO DO PROJETO

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 032/2010

Bauru, 5 de abril de 2012.

Senhor Professor,

Em atenção à solicitação de alteração no título do projeto de pesquisa “**Diferenciação e crescimento das células osteoblásticas durante o reparo ósseo alveolar normal e com uso terapêutico de um antiinflamatório não-esteroidal seletivo para COX-2 em ratos**” de autoria de Bruno Alvares Viscelli, sob sua orientação, para ESTUDO DOS EFEITOS DE UM ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDAL SELETIVO PARA COX-2 NA OSTEOGÊNESE E NA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS COX-2 E RUNX-2 DURANTE O REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM RATOS, informamos a aprovação *ad referendum* desta Comissão, considerando não haver impedimentos éticos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Rumio Taga

Docente do Departamento de Ciências Biológicas