UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

Carolina Fávaro Francisconi

**Caracterização morfométrica e molecular do papel da iNOS
no processo de reparo ósseo alveolar em condições
homeostáticas e infecciosas**

BAURU
2013

Carolina Fávaro Francisconi

**Caracterização morfométrica e molecular do papel da iNOS
no processo de reparo ósseo alveolar em condições
homeostáticas e infecciosas**

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

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Versão Corrigida

BAURU
2013

Francisconi, Carolina Fávaro

F847c

Caracterização morfométrica e molecular do papel da iNOS no processo de reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas e infecciosas / Carolina Fávaro Francisconi. – Bauru, 2013.

147 p. : il. ; 31cm.

Tese. (Mestrado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP.

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

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa
em Animais da FOB-USP
Protocolo nº: 024/2011
Data: 20/10/2011

Dedicatória

Dedico este trabalho especialmente à minha família, verdadeira razão do meu viver, base sólida sobre a qual edifico todos os meus sonhos... Minha força contra as intempéries diárias, fonte permanente de descobertas, de surpresas, de generosidade, de conforto e de amor...

A Deus,

por guiar meus passos e iluminar minha caminhada, transformando os obstáculos em grandes oportunidades. Por fazer-me forte quando me sinto fraca, abençoar-me com incontáveis graças, fazer-me acreditar sempre no poder da fé e, por fim, estar sempre ao meu lado!

Aos meus pais, Paulo e Marinelci,

por proporcionarem-me a vida e por permanecerem ao meu lado em todos os momentos de minha existência. Pelo amor incondicional, pelos conselhos, orações, palavras de apoio, preocupação e, principalmente, por serem meus maiores exemplos de vida. Vocês não apenas nos dão oportunidades, mas, acima de tudo, nunca nos deixam desistir. Se algo em mim for passível de despertar admiração, devo isso a vocês. Meu amor por vocês é imenso e eterno.

Às minhas irmãs, Manoela e Luciana,

por serem minhas companheiras e melhores amigas. Pela sensibilidade que demonstram ao me ouvir, por alegrarem-se quando me alegro e por preocuparem-se quando desanimo. Por me ampararem sempre que precisei, dando-me coragem e força pra seguir em frente. Não saberia viver sem vocês. Amo vocês, incondicionalmente.

Aos meus irmãozinhos, Rafinha e Gabi,

por demonstrarem que não é preciso tamanho para enfrentar os problemas da vida, mas é preciso fé, determinação e coragem pra seguir em frente. Agradeço a convivência desses dois anos, a paciência e a alegria compartilhada em cada momento que passamos juntos. Saibam que eu aprendi muito com vocês e que vocês moram em meu coração. Amo vocês!

Ao meu noivo, Ni,

por ter me dado a oportunidade de descobrir esse sentimento tão maravilhoso e sublime que é o amor . Agradeço sua compreensão, sua companhia e por me fazer a pessoa mais feliz do mundo... Confiança, admiração e respeito nutrem o amor, despretensioso, maduro e sincero, que sinto por você. Agradeço, extensivamente, ao Edson, Cláudia, Fer, Eduardo e Dudu por serem pessoas maravilhosas que sempre me recebem de braços abertos. Obrigada pelo carinho, apreço e doação. Cada um de vocês tem seu lugar particular em meu coração.

Aos meus avós, Pedro e Eunísia; Helena e Eugênio,

por demonstrarem com suas experiências as trilhas certas a seguir na vida, sendo assim, essenciais ao meu desenvolvimento, sendo símbolos de estabilidade e de fidelidade aos valores morais. “Vô” Pedro e “Vó” Nísia, obrigada pelo incentivo, pelos conselhos e pela eterna vigilância. Obrigada pelos momentos felizes que proporcionam a todos nós e pela família maravilhosa que vocês construíram. “Vó” Helena, obrigada pelo carinho, pelas orações, pela preocupação constante e por todos os mimos de avó. “Vô” Geninho, obrigada por proteger-me e por guiar meus passos aí do céu. Meu amor por vocês é imenso...

Aos meus tios, Jacinto, Lucelena, Pedro, Neto e Cristina

pelo carinho e estímulo. Por todos os momentos que passamos juntos, pela preocupação constante e principalmente, pela disponibilidade que sempre tiveram para me escutar e aconselhar. Tenho orgulho de tê-los como tios e amigos. Obrigada por tudo!

Aos meus primos Renato, Fernando e Rafão,

Ao Rê e ao Fer, por serem primos maravilhosos, importando-se com a minha felicidade, por animar-me quando precisei, e por toda infância e posteriormente baladas que passamos juntos. Ao Rafão, por fazer-me rir das coisas mais inusitadas.

Aos meus cunhados, Pedro e Bruno, e às minhas “cunhadinhas”, Deisi e Kenia,

por, ao fazerem minhas irmãs e primos felizes, também proporcionarem-me a felicidade. Vocês sabem valorizar a boa convivência e conquistam, a cada dia, minha admiração. Obrigada pela companhia despretensiosa e constante. Saber que vocês torcem por minha realização profissional e pessoal é estímulo para que eu continue lutando por meus objetivos.

Às minhas amigas, Fabi, Gi, Grá, Kel, Kika, Lê, Maria Fernanda, Mariana, Ná e Paty,

ter amigos como vocês evidencia-me o quanto é bom compartilhar os sonhos e dividir as alegrias. Mesmo que estejamos distantes, ao traçarmos caminhos distintos pela vida afora, vocês sempre representarão o real significado da palavra amizade. Obrigada pelo convívio amigo e familiar em todas as nossas atividades. Fabi e Gi, saibam que nossa amizade foi essencial nessa fase da minha vida, vocês me ajudaram muito e tudo ficou mais fácil com vocês ao meu lado. Muito obrigada! Vocês moram em meu coração e podem contar comigo sempre!

Aos meus amigos e colaboradores, Andreia, Cadu e Claudinha,

por colaborarem, prontamente, para com a realização do meu sonho de seguir a carreira acadêmica e, assim, concluir o mestrado nesse momento. Agradeço cada momento dedicado a mim e à conclusão dessa dissertação, tanto na parte experimental quanto na escrita da tese, pude contar com a disponibilidade e colaboração de vocês. Saibam que eu tenho muita admiração por cada um de vocês e que podem contar comigo. Muito obrigada!

À Mari,

nosso anjo da guarda. Não conseguiríamos imaginar nossa casa sem a sua dedicação e o seu carinho. Você tem um lugar todo especial em nossos corações.

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet, Professor do Departamento de Histologia e Embriologia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP) e meu querido orientador, agradeço por todas as oportunidades oferecidas durante o meu mestrado. Com seu espírito determinado, permitiu que eu ampliasse meus horizontes profissionais e me estimulou a buscar o conhecimento e a expressar o que há de melhor dentro de mim. Obrigada pela disponibilidade em me orientar neste trabalho, pelo estímulo ao meu crescimento na vida acadêmica e por ter-me orientado de forma sábia, respeitando minhas opiniões e, ao mesmo tempo, guiando-me pelo melhor caminho. Acima de tudo, obrigada por ser exemplo a ser seguido e por não poupar esforços em me ajudar. MUITÍSSIMO obrigada, por tudo.

Aos demais professores do Departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP, sempre dedicados à arte de ensinar, pelo acolhimento e pelos ensinamentos recebidos.

Aos alunos do Departamento de Histologia, Adriane, Ana Cláudia, Andreia, Bruna, Cadu, Carol Rocha, Claudinha, Dani, Élcia, Gabi, Jéssica, Paulinha, Ricardo e Tamiris por me receberem tão bem no laboratório, dividindo comigo, não só o espaço físico, mas também momentos de paciência, dedicação e compreensão. Gostaria de agradecer especialmente a Andreia, Cadu e Claudinha pela ajuda essencial que dispensaram na realização desse trabalho, tanto para a realização da parte metodológica quanto na parte escrita. Agradeço a colaboração, paciência e amizade.

Aos amigos das turmas contemporâneas de Mestrado e Doutorado em Biologia Oral, por tudo o que passamos juntos. Espero que, daqui a alguns anos, possamos lembrar-nos da nossa pós-graduação com carinho e saudade.

Às técnicas do laboratório de Histologia, Tânia, Danielle e Patrícia pelo profundo senso de dedicação e responsabilidade e pela inestimável ajuda prestada neste trabalho.

À querida secretária Teresa, não só pela capacidade de realizar todas as suas tarefas com dedicação e eficiência, mas principalmente pelo bom-humor, alegria e vontade de realizá-las. Sua dedicação e boa-vontade sempre fizeram a diferença!

Aos professores, funcionários e amigos do Departamento de Histologia, pelo carinho e atenção com que me trataram, pela dedicação, pelo incentivo, colaboração e ajuda e por serem amigos de todas as horas.

À secretária do Curso de Biologia Oral, Vera Lúcia Rosa Ruffino pela sua eficiência, atenção e disponibilidade dedicada ao nosso curso de pós-graduação e aos seus alunos.

Aos funcionários e amigos de longa data do Departamento de Materiais Dentários, Sandrinha, Lô e Alcides, por serem, mais que amigos, parte imprescindível da família Francisconi. Obrigada pela companhia diária e por não pouparem esforços para que tudo dê sempre certo. Acima de tudo, obrigada por receber todo e qualquer aluno de braços e corações abertos, jamais negando qualquer tipo de contribuição: de um cafezinho a um importante conselho.

A todos os demais professores e funcionários da FOB-USP, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos alunos da graduação, por confiarem nos alunos de pós-graduação e aceitarem nossos singelos conselhos e discreta experiência já vivenciada. Vocês são muito importantes para nosso crescimento profissional e acabam tornando-se amigos que serão para sempre lembrados.

Meus sinceros agradecimentos

Agradecimentos Institucionais

Ao **Prof. Dr. João Grandino Rodas**, digníssimo reitor da Universidade de São Paulo;

Ao **Prof. Dr. José Carlos Pereira**, digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo;

À **Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**, digníssima Vice-diretora da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo;

Ao **Prof. Dr. Ruy Cesar Camargo Abdo**, digníssimo Prefeito do Campus da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo;

Ao **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**, digníssimo Presidente da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo;

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, órgão de fomento deste trabalho (processo nº 2010/13626-7).

E a todos que, de alguma maneira, tornaram este sonho realidade...

...Meu muito obrigada!

“A ciência se cala quando a fé se inicia. A fé transcende a lógica, é uma convicção em que há ausência de dúvida. A ciência sobrevive da dúvida. Quanto maior for a dúvida, maior poderá ser a dimensão da resposta. Sem a arte da dúvida, a ciência não tem como sobreviver e expandir a sua produção de conhecimento.”

Augusto Cury

Resumo

RESUMO

A óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é uma enzima responsável pela síntese do óxido nítrico, envolvido na regulação de vários processos fisiológicos, com destaque para relevantes efeitos sobre o tecido ósseo. Entretanto, o papel da iNOS no reparo ósseo alveolar permanece pouco conhecido. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar o papel da iNOS no processo de reparo ósseo alveolar pós-exodontia em condições homeostáticas (controle) e infecciosas em camundongos. Para isso, foram utilizados animais das linhagens WT (C57Bl/6) e iNOSKO, divididos em 2 grupos, condição homeostática (exodontia do incisivo superior direito) e alveolite experimental (induzida pela inoculação de uma suspensão de cultura bacteriana), e analisados de acordo com os diferentes períodos experimentais (0, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia), através da análise histomorfométrica e molecular. Na análise histomorfométrica, avaliou-se a densidade de volume das estruturas referentes ao coágulo sanguíneo, tecido conjuntivo e tecido ósseo. Na análise molecular, quantificou-se a expressão de mRNA codificando genes de marcadores do metabolismo ósseo; marcadores de osteoclastos; citocinas e quimiocinas, através de reações de RealTimePCR. A expressão de iNOS esteve presente durante todo o processo de reparo ósseo alveolar nos camundongos C57Bl/6, porém de maneira mais expressiva no período de 7 dias pós-exodontia, e se mostrou aumentada pela indução de alveolite. A análise histomorfométrica demonstrou discretas alterações no processo de reparo ósseo alveolar, na ausência de iNOS, tanto em condições homeostáticas quanto infecciosas. Em condições homeostáticas, a ausência de iNOS não impactou de forma significativa o processo de reparo ósseo alveolar pós-exodontia, mas se mostrou associada à modulação de vasos sanguíneos. Já em condições infecciosas, a ausência de iNOS se mostrou associada à modulação de células inflamatórias, osteoblastos e osteoclastos. De forma geral, conclui-se que embora a enzima iNOS module certos aspectos do processo de reparo ósseo alveolar de forma pontual, sua ausência não interferiu de forma significativa nesse processo.

Palavras-chaves: Óxido nítrico. Tecido Ósseo. Alvéolo seco

Abstract

ABSTRACT

Morphometric and molecular characterization of the role of iNOS in alveolar bone repair process in homeostatic and infectious conditions.

The inducible nitric oxide synthase (iNOS) is an enzyme responsible for the synthesis of nitric oxide, a reactive molecule involved in the regulation of several physiological processes, highlighting relevant effects on bone tissue. However, the role of iNOS in alveolar bone repair remains unknown. The aim of this study was to characterize the role of iNOS in alveolar bone healing process after dental extraction in homeostatic and infectious conditions in mice. With this aim, WT (C57Bl/6) and iNOSKO mice strains were divided into 2 groups, homeostatic condition (extraction of the upper right incisor) and experimental alveolitis (induced by inoculation of a suspension of bacterial culture), and analyzed according to the different experimental periods (0, 7, 14 and 21 days post-extraction), through molecular and histomorphometric analysis. In histomorphometric analysis, the volume density of structures related to blood clot, tissue and bone were evaluated. The molecular analysis quantified the expression of mRNA encoding genes of defined as bone metabolism markers; osteoclast markers, as well cytokines and chemokines through RealTimePCR reactions. The expression of iNOS was detected during the all process of the alveolar bone repair in C57Bl/6 mice, with an expression peak at 7 days post-extraction time point, and was significantly enhanced by alveolitis induction. Histomorphometric analysis showed small changes in alveolar bone repair process in the absence of iNOS, in both homeostatic as infectious conditions. Under homeostatic conditions, the absence of iNOS did not impact significantly the process of alveolar bone healing after dental extraction, but it was associated with modulation of blood vessels formation. In the infectious conditions scenario, the absence of iNOS was associated with modulation of inflammatory cells, osteoblasts and osteoclasts counts. In general, it is concluded that even the enzyme iNOS module some aspects of alveolar bone repair in a particular and punctual manner, their absence does not interfere significantly in the overall outcome of alveolar bone repair process.

Key words: Nitric oxide. Bone and Bones. Dry Socket.

Listas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Camundongo da linhagem C57Bl/6-WT (a). Procedimento cirúrgico para realização da exodontia (b). Exodontia do incisivo superior direito (c). Alvéolo pós-exodontia (d).	47
Figura 2	- Distribuição dos campos para análise de morfometria do alvéolo pós-exodontia (a) e retículo de integração sobre a imagem de um corte histológico (b).	51
Figura 3	- Cinética de expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 e iNOSKO em condições homeostáticas e submetidos à alveolite experimental. Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) e modificados geneticamente para não expressarem iNOS (iNOSKO) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de iNOS foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 4 animais por grupo em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. Figura 4 - Fotomicrografia de cortes histológicos obtidos da região média dos alvéolos de camundongos WT e iNOSKO em condições homeostáticas após exodontia nos períodos de 0 e 7 dias. HE, aumento 10x e 40x.	58
Figura 4	- Fotomicrografia de cortes histológicos obtidos da região média dos alvéolos de camundongos WT e iNOSKO em condições homeostáticas após exodontia nos períodos de 0 e 7 dias. HE, aumento 10x e 40x.	61
Figura 5	- Fotomicrografia de cortes histológicos obtidos da região média dos alvéolos de camundongos WT e iNOSKO em condições homeostáticas após exodontia nos períodos de 14 e 21 dias. HE, aumento 10x e 40x.	63
Figura 6	- Fotomicrografia de cortes histológicos obtidos da região média dos alvéolos de camundongos WT e iNOSKO em condições infecciosas (alveolite experimental) após exodontia nos períodos de 0, 7 e 21 dias. HE, aumento 10x e 40x.....	67

Figura 7	- Densidade de volume das estruturas presentes no alvéolo dentário (%) nos camundongos WT e iNOSKO em condições homeostáticas (WT-C; iNOSKO-C) e alveolite experimental (WT-A; iNOSKO-A). Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados.....	70
Figura 8	- Densidade de volume das estruturas presentes no alvéolo dentário (%) nos camundongos WT e iNOSKO em condições homeostáticas (WT-C; iNOSKO-C) e alveolite experimental (WT-A; iNOSKO-A). Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados.....	71
Figura 9	- Análise comparativa da densidade de volume das estruturas presentes no alvéolo dentário (%) nos camundongos WT e iNOSKO em condições homeostáticas (controle). Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. Diferença estatisticamente significativa só foi observada no período de 14 dias, em relação à densidade de volume dos vasos sanguíneos.....	73
Figura 10	- Análise comparativa da densidade de volume das estruturas presentes no alvéolo dentário (%) nos camundongos WT e iNOSKO em condições de alveolite experimental. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros: coágulo sanguíneo, no período de zero hora; osteoblastos, no período de 7 dias e osteoclastos, no período de 21 dias pós exodontia.	75
Figura 11	- Cinética de expressão de quimiocinas envolvidas no metabolismo ósseo no tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 e iNOSKO em condições homeostáticas e submetidos à alveolite experimental. Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) e modificados geneticamente para não expressarem iNOS (iNOSKO) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de CXCL1, CCL2 e CCL5 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD da intensidade de expressão de mRNA para os genes alvos, normalizados pela expressão da beta-actina, obtidos de 4 animais por grupo em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes.....	78

-
- Figura 12 - Cinética de expressão de citocinas no tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 e iNOSKO em condições homeostáticas e submetidos à alveolite experimental. Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) e modificados geneticamente para não expressarem iNOS (iNOSKO) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de IL-10, IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD da intensidade de expressão de mRNA para os genes alvos, normalizados pela expressão da beta-actina, obtidos de 4 animais por grupo em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes.80
- Figura 13 - Cinética de expressão de marcadores do metabolismo ósseo no tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 e iNOSKO em condições homeostáticas e submetidos à alveolite experimental. Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) e modificados geneticamente para não expressarem iNOS (iNOSKO) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de COL1A1, BMP2, RUNX2, ALP, OCN, DMP1 e PHEX foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD da intensidade de expressão de mRNA para os genes alvos, normalizados pela expressão da beta-actina, obtidos de 4 animais por grupo em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes.82
- Figura 14 - Cinética de expressão de marcadores de osteoclastos no tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 e iNOSKO em condições não infecciosas e submetidos à alveolite experimental. Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) e modificados geneticamente para não expressarem iNOS (iNOSKO) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de RANKL, OPG e CTSK foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD da intensidade de expressão de mRNA para os genes alvos, normalizados pela expressão da beta-actina, obtidos de 4 animais por grupo em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes.....84
-

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela de contingência contendo o número de animais de cada tempo por período experimental e por procedimento de análise a ser realizado.....	46
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°	graus.
%:	por cento.
µl:	microlitro.
µm:	micrômetro.
cm:	centímetro.
et al.:	colaboradores.
ALP:	fosfatase alcalina.
BMPs:	proteínas morfogenéticas ósseas.
cDNA:	DNA complementar.
CEEPA:	Comissão de Ética em Pesquisa com Animais.
COL-I:	colágeno do tipo I.
CT:	do inglês “cycle threshold”, traduzido como ciclo limiar.
CTSK:	catepsina K.
C57Bl/6-WT:	camundongo 57 black/6 (normal).
DMP1:	do inglês “dentin matrix acidic phosphoprotein 1” traduzido como fosfoproteína ácida da matriz dentinária
DNA:	ácido desoxirribonucléico.
ECM :	matriz colagenosa extracelular.
EDTA:	etilenodiaminotetra acético sal dissódico.
FMRP/USP:	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
FOB/USP:	Faculdade de Odontologia de Bauru / Universidade de São Paulo.
g:	gramas.
H ⁺ :	íons ácidos.
IFN-γ:	Interferon-gama.
iNOSKO:	camundongo geneticamente modificado para o gene da iNOS.
<i>in vivo</i> :	do latim “dentro do vivo” traduzido como dentro do organismo.
<i>in vitro</i> :	do latim “ em vidro” traduzido como processo biológicos que tem lugar fora dos sistemas vivos.
IL:	interleucina.

IL-1:	interleucina-1.
IL-1 β :	interleucina-1 beta.
IL-2:	interleucina-2.
IL-4:	interleucina-4.
IL-6:	interleucina-6.
IL-10:	interleucina-10.
IL-12:	interleucina-12.
KO:	animal geneticamente modificado (<i>Knockout</i>).
LPS:	lipopolissacarídeos.
mg/kg:	miligramas por quilo.
MIP-2:	do inglês “macrophage-inflammatory protein-2” traduzido como proteína inflamatória de macrófagos-2.
ml:	mililitros.
MMP:	do inglês “matrix metalloproteinase” traduzido como metaloproteinase da matriz.
mRNA:	RNA mensageiro.
NF- κ B:	do inglês “nuclear factor <i>kappa</i> B” traduzido como fator de transcrição nuclear <i>kappa</i> B.
nm:	nanômetro.
NO:	óxido nítrico.
NOS:	do inglês “nitric oxide synthase” traduzido como enzimas NO sintases.
NOS1/nNOS:	do inglês “nitric oxide synthase 1 (neuronal)” traduzido como enzima NO sintase produzida por neurônios.
NOS2/ iNOS:	do inglês “nitric oxide synthase 2 (inducible)” traduzido como enzima NO sintase induzível / óxido nítrico sintase induzível.
NOS3/eNOS:	do inglês “nitric oxide synthase 3 (constitutive)” traduzido como enzima NO sintase produzida por células endoteliais ou constitutivas.
OCN:	osteocalcina.
OPG:	osteoprotegerina.
P:	número total de pontos existentes no retículo.
p:	nível de significância, probabilidade.

PHEX:	do inglês “phosphate regulating endopeptidase homolog” traduzido como fosfato de regulação homóloga de endopeptidase.
Pi:	estruturas consideradas.
PBS:	do inglês “phosphate buffered saline” traduzido como tampão fosfato-salino.
pH:	potencial hidrogeniônico.
Proc.:	Processo.
RANK:	do inglês “receptor activador of NKkappa B” traduzido como receptor de ativação do fator nuclear kappa B.
RANKL:	do inglês “receptor activador of NKkappa B ligand” traduzido como ligante do receptor de ativação e associação ao NK-kappa B.
RNA:	ácido ribonucléico.
RNIs:	intermediários reativos de nitrogênio.
RUNX2/CBFA1:	do inglês “Runt-related transcription factor 2” traduzido como fator de transcrição relacionado ao Runt 2, também conhecido como fator nuclear de ligação da subunidade alfa-1.
SNP:	nitroprussiato de sódio doador de NO.
TGF-β:	do inglês “transforming growth factor” traduzido como fator transformador de crescimento.
TIMP:	do inglês “tissue inhibitors of matrix metalloproteinase” traduzido como inibidores teciduais das metaloproteinases da matriz.
TNF-α:	do inglês “alfa tumor necrosis factor” traduzido como fator de necrose tumoral alfa.
TNFRSF1A/TNFR1:	receptor do fator de necrose tumoral 1.
TNFRSF1B/TNFR2:	receptor do fator de necrose tumoral 2.
VEGF:	do inglês “vascular endothelial growth factor” traduzido como fator de crescimento do endotélio vascular
Vvi:	densidade em volume.
WT:	camundongos selvagem (<i>wild- tipe</i>).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	23
2	PROPOSIÇÃO	39
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1	Animais de experimentação	45
3.2	Procedimentos cirúrgicos	46
3.3	Alveolite Experimental	47
3.4	Coleta das amostras.....	48
3.5	Procedimentos Histotécnicos	49
3.6	Análise histológica	49
3.7	Extração de RNA e Transcrição Reversa	52
3.8	Reações de RealTimePCR.....	53
3.9	Análise Estatística	54
4	RESULTADOS.....	55
4.1	Caracterização da cinética de expressão da iNOS no processo de reparo ósseo alveolar:.....	57
4.2	Análise histológica comparativa da cinética do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos WT e iNOSKO:	59
4.2.1	Camundongos WT (WT-Control) e iNOSKO (iNOSKO- Control) em condições homeostáticas:.....	59
4.2.2	Camundongos WT (WT-Alveolite) e iNOSKO (iNOSKO- Alveolite) após indução da alveolite experimental:	65
4.3	Análise histomorfométrica da densidade de volume de diferentes estruturas alveolares na cinética do reparo ósseo alveolar em camundongos WT e iNOSKO em condições homeostáticas e de alveolite experimental	69

4.3.1	Influência da iNOS na cinética do reparo ósseo alveolar em camundongos, em condições homeostáticas	72
4.3.2	Influência da iNOS na cinética do reparo ósseo alveolar em camundongos, na presença da alveolite	74
4.4	Análise da expressão de marcadores do metabolismo ósseo, marcadores de osteoclastos, quimiocinas e citocinas	76
4.4.1	Análise molecular da expressão de quimiocinas	77
4.4.2	Análise molecular da expressão de citocinas	79
4.4.3	Análise molecular da expressão de marcadores do metabolismo ósseo	81
4.4.4	Análise molecular da expressão de marcadores de osteoclastos.....	83
5	DISCUSSÃO	85
6	CONCLUSÕES	107
	REFERÊNCIAS	111
	APÊNDICES.....	137
	ANEXOS	145

1 Introdução e Revisão de Literatura

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O tecido ósseo é um tecido mineralizado de natureza conjuntiva que se dispõe formando os ossos, estruturas rígidas e resistentes que formam o esqueleto, apresentando funções de suporte, proteção, locomoção, bem como reserva de minerais. O tecido ósseo é constituído por células, como: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos; e pela matriz óssea, correspondente ao material extracelular mineralizado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os osteoblastos são as células ósseas mononucleadas, de origem mesenquimal (CERRI, 2005; MACKIE, 2003) e apresentam três possíveis destinos, apresentando diferentes estágios de diferenciação - imersão por matriz mineral, morte por apoptose, ou “repouso” como uma célula de revestimento (MANOLAGAS, 2000). As células da linhagem osteoblástica são, portanto, heterogêneas. Os osteoblastos maduros, presentes na superfície óssea, produzem matriz extracelular (colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, proteoglicanas, fosfoproteínas e citocinas) (KATCHBURIAN; CERRI, 2002; RODAN, 1998), e expressam marcadores de diferenciação terminal, como a osteocalcina. Durante a formação óssea, alguns osteoblastos ficam incorporados na matriz óssea e diferenciam-se em osteócitos, células elípticas, que possuem diversos prolongamentos citoplasmáticos, situados no interior de pequenos canais denominados canalículos ósseos (COLOPY et al., 2004; KNOTHE TATE et al., 2004; PARFITT, 2002). Acredita-se que os osteócitos atuem como sensores de estímulos mecânicos no tecido ósseo, por detectarem e alterarem o fluxo de fluidos que correm pelos canalículos ósseos (VAN'T HOF; RALSTON, 2001).

Os osteoclastos, por sua vez, são células provenientes de tecidos hematopoiéticos (KATCHBURIAN; CERRI, 2002; SODEK; MCKEE, 2000). Diferente dos osteoblastos que são células formadoras da matriz óssea, os osteoclastos apresentam como função principal a reabsorção do tecido ósseo, o que é alcançado a partir de sua capacidade de secreção de ácido (íons H^+), colagenase e outras enzimas que atuam localmente digerindo a matriz orgânica e dissolvendo os cristais de sais de cálcio (GARLET et al., 2006; KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; TEITELBAUM, 2000).

Além da constituição celular, o tecido ósseo também apresenta a matriz óssea, constituída por uma parte inorgânica e uma parte orgânica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). O colágeno tipo I é a proteína mais abundante na matriz óssea e constitui cerca de 90% da parte orgânica da matriz (OWEN et al., 1990). Outro importante grupo de proteínas, extraídas da matriz óssea desmineralizada, são as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNODIS, 2005). Essas proteínas são produzidas por células mesenquimais, osteoblastos e condrócitos, e são responsáveis por desencadear uma cascata de eventos para formar tecido ósseo e cartilagem (REDDI, 2001; SAKOU, 1998). Além das BMPs, outras proteínas também são extraídas durante a desmineralização da matriz óssea, como é o caso da osteocalcina (OCN) (BRONCKERS et al., 2001; GERSBACH et al., 2004; SODEK; MCKEE, 2000). Já a parte inorgânica da matriz óssea refere-se, sobretudo, aos cristais de apatita. Os osteoblastos criam estruturas de nanocompósito de osso através da secreção de uma matriz colagenosa extracelular (ECM) em que os cristais de apatita, subsequentemente, vão se formar. O fosfato de cálcio foi identificado tanto dentro dos grânulos mitocondriais dos osteoblastos quanto em vesículas intracelulares que transportavam material para a ECM. Assim, a matriz colagenosa, secretada pelos osteoblastos, é progressivamente mineralizada por cristais de apatita carbonatada (BOONRUNGSIMAN et al., 2012).

Apesar do aspecto aparentemente inerte do tecido ósseo, esse tecido apresenta extrema plasticidade, sendo remodelado periodicamente (DATTA et al., 2008; KATCHBURIAN; ARANA, 2004). O tecido ósseo sofre remodelação de forma contínua, havendo remoção do tecido através do processo de reabsorção óssea, seguido pela formação óssea no mesmo local, permitindo, assim, a renovação tecidual e a manutenção de sua integridade anatômica e estrutural (BROWN; JOSSE, 2002; DUONG; RODAN, 2001). Os seres humanos remodelam seu esqueleto em diferentes taxas dependendo da localização do osso e de diversos fatores, incluindo as forças mecânicas, estado hormonal e influências imunológicas. No entanto, durante a remodelação óssea humana normal no esqueleto adulto, em média, 5 a 10% do osso existente são substituídos a cada ano (GALSON, 2011).

Também na cavidade oral, o tecido ósseo está em constante renovação e apresenta importante papel na sustentação dos dentes, formando os processos alveolares e o osso alveolar, tecido dinâmico onde se inserem fibras do ligamento periodontal, e que respondem rapidamente aos estímulos que induzem a formação e

a reabsorção tecidual (CARRANZA; UBIOS, 1997; KATCHBURIAN; ARANA, 2004; NANJI, 2008).

Além da renovação óssea presente na cavidade oral, o tecido ósseo alveolar exibe alta capacidade de reparo quando lesionado. Dessa forma, fraturas ósseas e pequenos defeitos produzidos por patologia ou trauma, como exodontias, reparam-se após algum tempo de tratamento, com a produção de novo tecido ósseo no local (AI-AQL et al., 2008; DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; PHILLIPS, 2005; TSIRIDIS; UPADHYAY; GIANNOUDIS, 2007). Por ser um procedimento cirúrgico que visa à remoção do dente alojado no alvéolo dentário e, conseqüentemente, resulta em lesão tecidual, a exodontia é, portanto, exemplo de reparo ósseo na cavidade oral (AI-AQL et al., 2008; DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; PHILLIPS, 2005; TSIRIDIS; UPADHYAY; GIANNOUDIS, 2007).

O processo de reparo alveolar ocorre por segunda intenção e é uma resposta fibroproliferativa cujo objetivo é restaurar o tecido ao seu estado original, provavelmente, mediado por diversos fatores de crescimento e citocinas (COTRAN; RAMZI et al., 1996; COTRAN et al., 1996; SWEET; BUTLER, 1977). É um processo complexo que envolve uma sequência de eventos, sendo seu início marcado pela inflamação em resposta a uma lesão inicial ao tecido (COTRAN et al., 1996). Sabe-se que diversos mecanismos estão envolvidos na formação de um tecido ósseo maduro, e esse processo depende da formação inicial de um coágulo sanguíneo.

Sua cronologia pode ser dividida em quatro fases após a formação e estabilização do coágulo sanguíneo. A fase de proliferação celular, que se inicia com os eventos vasculares e celulares da inflamação, responsáveis pela formação do coágulo e desenvolvimento do tecido conjuntivo a partir da substituição do tecido de granulação, onde muitas células e fibroblastos oriundos do ligamento periodontal e da medula óssea se diferenciam e proliferam. Nessa fase, a atividade dos fibroblastos é grande e eles sintetizam fibras colágenas e substância fundamental amorfa até a maturação do tecido conjuntivo, fase em que ocorre a redução do número de células e vasos. Nessa fase inicial do processo de reparo predomina a formação de colágeno, principalmente do tipo I (COL-I), um dos principais constituintes do tecido conjuntivo e uma proteína de importância fundamental na constituição da matriz extracelular, sendo responsável por grande parte de suas propriedades físicas (COTRAN et al., 1996).

Posteriormente, observa-se o aumento da angiogênese, de extrema importância para o processo de reparo. Um dos fatores pró-angiogênicos mais importantes é o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (FERRARA, 2000), responsável por estimular a angiogênese direta e indiretamente. Na sequência, inicia-se a formação de matriz orgânica pelos osteoblastos; e por último ocorre a mineralização da matriz e formação de trabéculas ósseas correspondentes à fase de diferenciação e mineralização óssea (COTRAN et al., 1996). Assim, a formação do tecido ósseo é dependente da diferenciação e ativação de osteoblastos, que levam à produção de diferentes proteínas (colagenosas e não colagenosas) e enzimas, como a fosfatase alcalina, as quais serão responsáveis pela mineralização do tecido ósseo em formação (STUCKI et al., 2001).

Ainda do ponto de vista odontológico, o entendimento dos mecanismos de reparo alveolar e de regulação do metabolismo ósseo pode ser aplicado ao processo de osseointegração de implantes e na movimentação dentária por meio de forças ortodônticas (DAVIES, 2003; GARLET et al., 2007; GARLET et al., 2008; HENNEMAN; VON DEN HOFF; MALTHA, 2008).

O metabolismo ósseo é mantido sob estrito controle, em um processo chamado de “coupled bone formation”, no qual a interação entre sinais bioquímicos gerados e transmitidos entre as células ósseas interligam o processo de reabsorção à neoformação óssea subsequente, permitindo a renovação do tecido ósseo sem alterações funcionais (BEHL et al., 2008; CHAN; DUQUE, 2002; HOROWITZ et al., 2001; LLOYD et al., 2009; MCCAULEY; NOHUTCU, 2002; ROSCHGER et al., 2008). A organização espacial e interação entre as células de reabsorção óssea (osteoclastos) e células formadoras de osso (osteoblastos), são denominadas unidades multicelulares ósseas (BMUs) e reconhecidas como a unidade funcional básica para a remodelação óssea (PARFITT, 1983; PARFITT, 1964; FROST, 1979; FROST, 1984). Na parte anterior de uma BMU, numa região denominada zona de reabsorção, osteoclastos ativos se aderem à superfície óssea e dissolvem o tecido através da secreção de uma mistura de proteases que degradam a matriz de colágeno, e íons de hidrogênio que reduzem o pH e dissolvem os minerais no micro-ambiente (VÄÄNÄNEN; LIU; LEHENKARI; UEMARA, 1998; ROODMAN, 1999). Na chamada zona de formação, os osteoblastos ativos preenchem a cavidade recém-formada, estabelecendo uma substância rica em colágeno conhecido como osteóide, que, posteriormente, sofre mineralização para formar novo osso (MARTIN;

BURR; SHARKEY, 1998; COWIN, 2001; PARFITT, 1994). A região entre a zona de reabsorção e de formação, referida como zona de inversão, contém precursores de ambas as linhagens celulares incorporadas em um estroma de tecido conjuntivo frouxo (PARFITT, 1994). Novas células precursoras e nutrientes são fornecidos à BMU por um pequeno capilar que cresce na mesma taxa conforme a BMU progride para dentro do osso. Assim, o desenvolvimento, a homeostasia e a capacidade de reparo do tecido ósseo dependem do balanço dinâmico da atividade de formação óssea pelos osteoblastos e reabsorção pelos osteoclastos (KARSENTY; WAGNER, 2002), bem como da expressão de proteínas responsáveis pela mineralização do tecido ósseo em formação (SOARES et al., 2005).

Diversos estudos demonstram que o controle do metabolismo ósseo é influenciado por diversos fatores locais e sistêmicos, com destaque para a recente associação do sistema imunológico com o sistema esquelético (BEHL et al., 2008; DATTA et al., 2008; HERMAN; KRONKE; SCHETT, 2008; LORENZO; HOROWITZ; CHOI, 2008; RAUNER; SIPOS; PIETSCHMANN, 2007; TAKAYANAGI, 2005; 2007). Há cerca de 40 anos, surgiram as primeiras observações em relação à influência das células do sistema imune nas funções das células ósseas. Desde então, avanços significativos têm ocorrido no nosso conhecimento em relação à interação entre as células imunes e ósseas, o que atualmente é denominado osteoimunologia (LORENZO et al., 2010).

Tal conexão entre o sistema imunológico e ósseo se baseia na interferência, durante o processo de remodelação óssea, dos mediadores produzidos pelas células do sistema imune: enquanto mediadores inflamatórios geralmente inibem a atividade dos osteoblastos e potencializam a atividade dos osteoclastos, mediadores anti-inflamatórios apresentam efeito oposto (GARLET et al., 2007; GARLET et al., 2006). Um exemplo de tal interação é a produção de RANKL (ligante do receptor de ativação do fator nuclear kappa B) por linfócitos T ativados, que desequilibra o balanço entre RANKL e OPG (osteoprotegerina), normalmente mantido sob estrito controle pelos osteoblastos.

Acredita-se que a expressão local dos sistemas RANK (receptor de ativação do fator nuclear kappa B), RANKL e OPG represente o principal fator regulador da remodelação óssea (LEE; LORENZO, 1999; TSUKII et al., 1998). Juntos, esses fatores formam um sistema parácrino que apresenta papel essencial na regulação, função e diferenciação dos osteoclastos (ROUX; ORCEL, 2000; TEITELBAUM,

2000). Estudos mostram que o RANKL é uma molécula essencial para a indução da osteoclastogênese, sendo expressa por células T ativadas e principalmente, por osteoblastos (LACEY et al., 1998; TAKAYANAGI, 2005; YASUDA et al., 1998). Seu receptor celular RANK é uma proteína transmembrana expressa em células progenitoras de osteoclastos (RHO; TAKAMI; CHOI, 2004), que funciona como um homotrímero e promove a diferenciação dos precursores dos osteoclastos e ativação dos osteoclastos maduros, iniciando o processo de reabsorção óssea (GALSON, 2011).

Por sua vez, OPG é expressa por osteoblastos, células do coração, rim, fígado e baço e também é produzida pelas células do estroma da medula óssea (BOYCE; XING, 2008; SODEK; MCKEE, 2000). Ela atua como um falso receptor solúvel para RANKL, inibindo a diferenciação dos osteoclastos por ligar-se, com alta afinidade, ao RANKL, impedindo a ligação dessa molécula ao seu receptor RANK, regulando negativamente a formação e ativação dos osteoclastos (GALSON, 2011).

De fato, em condições fisiológicas, os osteoblastos têm importante papel na regulação do sistema RANK/RANKL/OPG, mas a interferência de leucócitos e seus produtos sobre tal controle pode influenciar de forma decisiva a homeostasia do tecido ósseo (GARLET et al., 2006; HERMAN; KRONKE; SCHETT, 2008; KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; LORENZO; HOROWITZ; CHOI, 2008; RAUNER; SIPOS; PIETSCHMANN, 2007; TAKAYANAGI, 2007; TEITELBAUM, 2000; WADA et al., 2006). Estudos demonstram que tal conexão vai além de interferências em condições patológicas, uma vez que linfócitos B, ativados por linfócitos T, são responsáveis por grande parte dos níveis de OPG encontrados na circulação, e na ausência destas células, uma maior reabsorção óssea pode ser verificada de forma sistêmica, mesmo na ausência de processos infecciosos ou inflamatórios (LI et al., 2007).

Outro exemplo de interação entre o sistema esquelético e imunológico é a possível interferência de diversas citocinas no processo de reparo ósseo, como é o caso de TNF (fator de necrose tumoral). O gene TNF codifica uma citocina pró-inflamatória multifuncional que pertence à superfamília do TNF. Essa citocina é secretada principalmente por macrófagos e funciona através de seus receptores TNFR1 e TNFR2 (MCDERMOTT, 2001). A presença de TNF em um processo inflamatório determina uma resposta celular mais acentuada e maior estímulo à

migração de células inflamatórias, sendo sua expressão aumentada em tecidos doentes (BINIECKA et al., 2011).

Os demais marcadores do metabolismo ósseo podem ser divididos em marcadores de formação, que refletem a atividade dos osteoblastos, dentre os quais se destacam a fosfatase alcalina óssea e a osteocalcina; e os de reabsorção, que refletem a atividade dos osteoclastos, como os fragmentos derivados da reabsorção do colágeno, as piridinolinas e os telopeptídeos carboxi e amino terminais (VIEIRA, 1999).

A fosfatase alcalina, o colágeno tipo I e a osteocalcina são marcadores bioquímicos de formação no metabolismo ósseo, sendo os dois primeiros marcadores dos estágios iniciais de diferenciação osteoblástica, e o último, marcador dos estágios mais avançados da diferenciação celular (STUCKI et al., 2001).

A osteocalcina é um peptídeo secretado por osteoblastos maduros, condrócitos hipertrofiados e odontoblastos (GUNDBERG, 2000; VIEIRA, 1999). Estudos indicam que o aparecimento e o aumento da produção dessa proteína são coincidentes com o início do processo de mineralização, sendo assim, a produção de osteocalcina apresenta-se como um marcador de osteoblasto maduro (GUNDBERG, 2000; VIEIRA, 1999). Além do mais, estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a osteocalcina tem importante papel no recrutamento e diferenciação dos osteoclastos (CHENU et al., 1994).

Outro marcador importante de formação óssea é o RUNX2 (runt-related transcription factor 2), também chamado de CBFA-1 (Core Binding Factor A-1) que é essencial para a formação óssea membranosa e endocondral (SOARES et al., 2005). O RUNX2 é um membro da família RUNX de fatores de transcrição e é essencial para a diferenciação osteoblástica e para a morfogênese esquelética. Mutações nesse gene foram associadas com a displasia cleidocraniana, afetando o desenvolvimento ósseo (GERSBACH et al., 2004).

Além dos marcadores de formação óssea, das citocinas pró e anti-inflamatórias e do sistema RANK/RANKL/OPG, radicais livres como o óxido nítrico também parecem estar envolvidos no metabolismo do tecido ósseo.

O óxido nítrico (NO) é um radical livre envolvido na regulação de vários processos fisiológicos, tais como: modulação do sistema cardiovascular e relaxamento vascular (RADOMSKI; PALMER; MONCADA, 1987), regulação da

agregação plaquetária (RADOMSKI; PALMER; MONCADA, 1987), neurotransmissão (MURAD, 1986) e regulação da resposta imune (MONCADA; HIGGS, 1993). Além disso, sua alta atividade oxidativa contribui para a morte de microrganismos (BECKMAN et al., 1990), caracterizando o papel antimicrobiano do NO.

A molécula de óxido nítrico é sintetizada a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina por um grupo de isoenzimas denominadas coletivamente NO sintases (NOS). Essas isoenzimas existem em três isoformas distintas, as NOS constitutivas endoteliais (eNOS) e NOS neuronal (nNOS) e a isoforma da NOS induzível (iNOS). A eNOS, produzida por células endoteliais, e nNOS, sintetizada por neurônios, são constitutivamente expressas e liberam pequenas quantidades de NO durante um curto período de tempo. Ambas são ativadas e reguladas através das mudanças nas concentrações dos íons cálcio livres, no interior das células (FEELISCH; STAMLER, 1996).

Em contrapartida, a via iNOS é principalmente regulada no processo de transcrição e a sua ativação conduz à produção de uma grande quantidade de NO durante períodos prolongados de tempo (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Além disso, a iNOS (óxido nítrico sintase induzível) é produzida apenas após estímulos imunológicos por macrófagos e hepatócitos, em quantidades superiores aos níveis constitutivos. *In vitro*, a expressão desta enzima está associada à produção de óxido nítrico e à liberação de seus metabólitos, como nitrato, nitrito e peroxinitrito (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997; SHEFFLER et al., 1995). Acredita-se que a via iNOS seja capaz de gerar maior quantidade de NO por um tempo prolongado quando comparada a via eNOS (MONCADA; HIGGS, 1993; PALMER, 1993). Porém, como a ativação da iNOS depende da transcrição, gerada por um estímulo externo, essa produção não é tão rápida quanto a via eNOS (horas e segundos) (VAN'T HOF; RALSTON, 2001). Sendo assim, a grande diferença entre a atividade NOS constitutiva, fisiologicamente produzida, e a NOS induzível não está na concentração de NO gerada, mas na duração da expressão da enzima responsável e consequente síntese de NO (LAURENT; LEPOIVRE; TENU, 1996).

Após sua produção, o NO é um gás capaz de percorrer livremente o meio intracelular, através da membrana celular, e entre as células. Ele está envolvido na comunicação intracelular e intercelular, sendo capaz de se difundir mantendo seu potencial de ação (KENDALL; MARSHALL; BARTOLD, 2001; LANCASTER, 1997).

Ao contrário de outras moléculas de sinalização, o NO não se liga a receptores e sua meia-vida corresponde a segundos, sendo que seus efeitos são transitórios e locais (KENDALL; MARSHALL; BARTOLD, 2001).

Devido à sua capacidade de percorrer o meio intracelular, o NO também apresenta importante função na resposta de defesa do hospedeiro, podendo atuar como uma molécula citotóxica frente a fungos, bactérias, protozoários, bem como células tumorais e células próximas do sítio de produção (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Esta função deve-se à inibição da atividade enzimática intracelular pelo NO, como por exemplo, enzimas envolvidas na respiração mitocondrial e síntese de DNA (Ácido Desoxirribonucléico) (HIBBS JR et al., 1988; KENDALL; MARSHALL; BARTOLD, 2001; KOLB; KOLB-BACHOFEN, 1992; KRÖNCKE; FEHSEL; KOLB-BACHOFEN, 1997). Tais efeitos do NO parecem ser devido à sua ligação com grupamentos ferro-sulfur das enzimas (HIBBS JR et al., 1988; KRÖNCKE; FEHSEL; KOLB-BACHOFEN, 1997). Assim, o óxido nítrico tem sido envolvido na capacidade microbicida dos macrófagos em resposta a diferentes agentes infecciosos como *Leishmania major*, *Mycobacterium bovis*, *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi* (BOCCA et al., 1998; GREEN; NACY, 1993; GREEN et al., 1990; LIEW et al., 1991; VESPA; CUNHA; SILVA, 1994).

Entretanto, a ação citotóxica do NO em humanos é controversa. Os efeitos citostáticos e citotóxicos do NO dependem da indução da enzima óxido nítrico sintase (NOS), após ativação de macrófagos desafiados com LPS, IFN- γ e TNF- α . Na célula-alvo, o NO combina-se com grupos metais de enzimas responsáveis pela síntese de DNA e pelo ciclo respiratório, levando à morte celular (MONCADA; HIGGS, 1993). Dentro dos fagolisossomos, o óxido nítrico pode se combinar com peróxido de hidrogênio, gerado pela fagócito-oxidase, para produzir radicais peroxinitrito, altamente reativos, que podem eliminar microrganismos. Tal função do óxido nítrico pode ser demonstrada pelo achado de que camundongos *knockout* com deficiência de iNOS (iNOSKO) são mais suscetíveis a infecções bacterianas do que os animais Wild-Type (WT) (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2008).

Além da importância do NO na manutenção da homeostasia tecidual, atuando na vasodilatação, neurotransmissão e inibição da agregação e adesão plaquetárias (KENDALL; MARSHALL; BARTOLD, 2001) e do seu efeito microbicida (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2008), o óxido nítrico possui significativo efeito na modulação

da reabsorção óssea, atuando sobre células ósseas (EVANS; RALSTON, 1996). A isoforma endotelial é amplamente expressa no tecido ósseo em condições normais enquanto a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é expressa apenas em resposta a um estímulo inflamatório. Em relação à isoforma neuronal, ainda não está bem estabelecido se as células do tecido ósseo estão envolvidas em sua expressão (VAN'T HOF; RALSTON, 2001).

Evidências sugerem que o NO apresente efeito bifásico na reabsorção óssea. Assim, baixas concentrações de NO potencializam a reabsorção óssea induzida pela IL-1, uma vez que inibidores de óxido nítrico sintase inibem a ativação da IL-1 β e, conseqüentemente, a reabsorção óssea *in vitro* (RALSTON et al., 1995). A produção constitutiva do NO dentro dos osteoclastos parece ser essencial para o seu funcionamento normal, uma vez que inibidores de NOS inibem a atividade e mobilidade de osteoclastos isolados (VAN'T HOF; RALSTON, 2001). Acredita-se que citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β e TNF- α provoquem a ativação da via iNOS nas células ósseas, o que possivelmente potencializa a ação das citocinas inflamatórias induzindo a perda óssea (VAN'T HOF; RALSTON, 2001).

Por outro lado, altas concentrações de NO inibem a formação e ativação dos osteoclastos. Experimentos utilizando células e culturas orgânicas mostram que o IFN- γ combinado com IL-1 β e/ou TNF- α induz amplamente a expressão de iNOS, resultando em altas concentrações de NO que inibem a reabsorção óssea (BRANDI et al., 1995; LÖWIK et al., 1994; MACINTYRE et al., 1991; RALSTON et al., 1995). Tais concentrações têm sido consideradas responsáveis pelos efeitos inibitórios dessas citocinas e, conseqüentemente, pela reabsorção óssea (LÖWIK et al., 1994; RALSTON et al., 1994; RALSTON et al., 1995). Esse efeito inibitório da alta concentração de NO parece ser devido à inibição tanto da formação quanto da ativação dos osteoclastos e indução da apoptose dos progenitores osteoclásticos (VAN'T HOF; RALSTON, 1997).

Apesar dos estudos *in vitro* demonstrarem que altas concentrações de NO inibem a atividade osteoclástica, enquanto baixas a moderadas, potencializam a reabsorção óssea local, não há evidências *in vivo* do efeito tempo-dependente das altas concentrações desta molécula sobre as células osteoclásticas (CHAE et al., 1997; LAURENT; LEPOIVRE; TENU, 1996; RALSTON, 1997).

Estudos demonstram que o NO também apresenta um efeito bifásico sobre a ativação dos osteoblastos. Pequenas quantidades de NO, produzidas pelos

osteoblastos, podem atuar como estimuladores autócrinos do crescimento osteoblástico e produção de citocinas (RIANCHO et al., 1995). Porém, altas concentrações de NO, como após uma estimulação por enzimas pró-inflamatórias, apresentam potente efeito inibitório sobre o crescimento e diferenciação dos osteoblastos (DAMOULIS; HAUSCHKA, 1994; MANCINI et al., 2000; NUSSLER et al., 1992). Evidências sugerem que tal efeito ocorre devido, parcialmente, ao efeito pró-apoptótico do NO nos osteoblastos (DAMOULIS; HAUSCHKA, 1997; MOGI et al., 1999). Dessa forma, o NO parece apresentar função importante no metabolismo ósseo, modulando a atividade osteoblástica e osteoclástica, de acordo com sua concentração.

Além disso, o NO também parece atuar como um importante imunorregulador, sendo produzido por células do sistema imune como macrófagos e linfócitos T (SCHYTTE BLIX; HELGELAND, 1998; SHAPIRA; FROLOV; BEN-NATHAN, 2000; TAYLOR-ROBINSON et al., 1994). A produção de grande quantidade de NO por iNOS desempenha um papel importante em reações imunes e em muitos processos inflamatórios, incluindo doenças das articulações, tais como artrite reumatóide (EVANS; RALSTON, 1996; STEFANOVIC-RACIC; STADLER; EVANS, 1993).

Outro aspecto importante em relação à produção de NO pela iNOS refere-se à interferência de citocinas nesse processo. Citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IFN- γ (LIEW, 1994), bem como a endotoxina são indutores potentes da iNOS em uma ampla variedade de tipos celulares, ao passo que os glicocorticóides e citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e o fator de crescimento transformante- β (TGF- β) suprimem a produção de NO (BOGDAN et al., 1994; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

Alguns autores sugerem que macrófagos humanos necessitam de sinais adicionais para a indução de iNOS (SCHOEDON et al., 1987; WERNER et al., 1989), como a ação conjunta de TNF- α e IFN- γ com LPS (DINARELLO, 2000); outros acreditam que as células humanas são capazes de produzir inibidores autócrinos ou mesmo moléculas tóxicas que estariam suprimindo a indução de iNOS (OSWALD et al., 1992), como IL-10 e TGF- β (GAZZINELLI et al., 1992; VODOVOTZ, 1997).

Diferentes tipos celulares são capazes de produzir NO após a estimulação provocada por citocinas. Osteoblastos humanos e culturas de hepatócitos requerem o estímulo de duas ou mais citocinas para a síntese de quantidades significativas de

NO, (NUSSLER et al., 1992; RALSTON et al., 1994) enquanto condrócitos humanos podem ser induzidos por uma única citocina (IL-1 β ou TNF- α) (GRABOWSKI; MACPHERSON; RALSTON, 1996; LOTZ, 1999). Além disso, a síntese de NO tem sido observada em macrófagos (FROLOV et al., 1998; SCHYTTE BLIX; HELGELAND, 1998; LIEW et al., 1991; SHAPIRA; FROLOV; BEN-NATHAN, 2000) bem como em outras células como neutrófilos (FIERRO et al., 1999; OKAMOTO et al., 1997; TAKEICHI et al., 1998; WEBB; POLAK; EVANS, 2001), linfócitos T helper (TAYLOR-ROBINSON et al., 1994), fibroblastos (GANSOUGE et al., 1997; KENDALL; MARSHALL; BARTOLD, 2001), células epiteliais (ARANY et al., 1996; ROSS et al., 1998), osteoclastos (FOX; CHOW, 1998), osteoblastos (FOX; CHOW, 1998; LÖWIK et al., 1994), condrócitos (BLANCO et al., 1995; LÖWIK et al., 1994), células de Langerhans (ROSS et al., 1998), células endoteliais (LAPPIN et al., 2000; ROSBE et al., 1996) e mastócitos (BIDRI et al., 1997; KODA et al., 2000), podendo ter vários efeitos, dependendo do tipo de célula que produz, do sítio de liberação e da concentração produzida (MONCADA; HIGGS, 1993; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Sendo assim, a combinação de citocinas induz de maneira mais potente a produção de óxido nítrico, em comparação às citocinas únicas para a maioria dos tipos celulares (GRABOWSKI; MACPHERSON; RALSTON, 1996; RALSTON et al., 1994).

Dessa forma, podemos observar que iNOS/NO tem potenciais efeitos sobre as células ósseas, interferindo diretamente no processo de reparo ósseo, atuando tanto na formação como na reabsorção desse tecido. Assim sendo, as possíveis vias de indução de iNOS também interferem nesse processo. A própria lesão tecidual, causada na exodontia, é capaz de estimular a produção de NO, via iNOS. Além disso, citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IFN- γ bem como a endotoxina são indutores potentes da iNOS em uma ampla variedade de tipos celulares, tornando o processo infeccioso um potente estimulador da produção de NO.

Nesse contexto, destaca-se a alveolite, também conhecida como “osteíte alveolar” (BLUM, 2002), uma das complicações mais comuns no pós-operatório após a extração de dentes permanentes, que pode alterar a resposta do hospedeiro e influenciar de forma marcante o processo de reparo ósseo (BLUM, 2002; CARDOSO, 2009; NOROOZI; PHILBERT, 2009; RODRIGUES, 2007; TORRES-LAGARES et al., 2005). Clinicamente, a alveolite caracteriza-se por dor severa de início entre o primeiro e o terceiro dia após a exodontia, associada com um alvéolo

dentário completamente vazio ou parcialmente ocupado por coágulo sanguíneo normal, com ou sem halitose (CARDOSO et al., 2010). Apesar do odor, dor e outros sintomas, os alvéolos acometidos pela infecção aguda, característica da alveolite, apresentam processo de reparo, embora seja significativamente mais demorado em comparação aos alvéolos saudáveis (RODRIGUES et al., 2011).

A etiologia da alveolite é ainda indefinida, mas sabe-se que diversos fatores locais e sistêmicos podem estar associados ao seu surgimento. Um quadro de alveolite verdadeira é caracterizado pela perda prematura parcial ou total do coágulo sanguíneo formado no interior do alvéolo pós-exodontia (BLUM, 2002; VEZEAU, 2000), assim, diversos estudos clínicos e experimentais apontam o aumento na atividade fibrinolítica local como principal fator na etiopatogenia da alveolite (BIRN, 1970; 1972a; b; 1973).

As extrações cirúrgicas que envolvem confecção de retalho e odontosseção também são apresentadas como fatores predisponentes da alveolite (LILLY et al., 1974). O trauma durante a extração, assim como a curetagem enérgica danifica as células do osso alveolar, causando inflamação da medula óssea alveolar e consequente liberação de mediadores celulares para o alvéolo, onde podem desencadear atividade fibrinolítica (BIRN, 1973).

Outros fatores predisponentes à instalação da alveolite envolvem a presença de restos dentários e ósseos no interior do alvéolo, assim como a má qualidade da higiene bucal e consequente contaminação alveolar (BIRN, 1973; PENARROCHA et al., 2001; RUD, 1970; SERRATI et al., 2006).

Evidências ainda sugerem uma interação complexa entre trauma local excessivo e invasão bacteriana. Essa associação culmina com a formação da plasmina e, consequentemente, com a fibrinólise no interior do alvéolo (BLUM, 2002; DE CARVALHO; OKAMOTO; DE CARVALHO, 1982). Estudos demonstram que os pirógenos secretados pelas bactérias são ativadores indiretos da fibrinólise *in vivo* (CATELLANI, 1979).

Dentre os microrganismos diretamente envolvidos na alveolite, verificou-se a presença de *Streptococcus α* e *β-hemolítico*s em material coletado de alvéolos dentários humanos (BROWN; MERRILL; ALLEN, 1970). Além disso, observou-se atraso na cronologia de reparo alveolar em animais inoculados com a associação entre *Actinomyces viscosus* e *Streptococcus mutans* (ROZANIS; SCHOFIELD; KOGON, 1976). Uma possível relação entre microrganismos anaeróbios

(predominantes na pericoronarite) com a etiologia da alveolite também foi demonstrada (NITZAN; SPERRY; WILKINS, 1978), assim como bactérias anaeróbias periodontopatógenas que são microrganismos potencialmente desencadeantes da alveolite. Alguns estudos observaram alta atividade fibrinolítica de bactérias periodontopatógenas, como o *Porphyromonas gingivalis*; *Fusobacterium nucleatum* (MITCHELL, 1986) e *Treponema denticola* (NITZAN; SPERRY; WILKINS, 1978).

Em modelo experimental de alvéolos infectados de ratos, identificaram-se microrganismos Gram negativos anaeróbios estritos, como o *Bacterioides fragilis*, presentes em 100% dos alvéolos infectados (D'ANTONIO, 1984), além de outros microrganismos, como: *Enterococos*, *Streptococcus viridans*, *Bacillus corineforme*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii* e *E. coli* proveniente do material biológico intra-alveolar (DE MELO JUNIOR et al., 2002).

Por fim, diversos fatores podem influenciar o processo de reparo ósseo alveolar, com destaque para a interferência das citocinas nesse processo. Por outro lado, condições infecciosas, como é o caso da alveolite, interfere diretamente na produção dessas citocinas, que por sua vez, interfere, de maneira direta ou indireta na produção de NO pela iNOS. De modo que, citocinas pró-inflamatórias e iNOS atuem de forma complementar, uma vez que essas citocinas provocam a ativação da via iNOS que, por sua vez, potencializa a ação das citocinas inflamatórias, interferindo de maneira significativa no processo de reparo ósseo alveolar. Assim sendo, a presença de bactérias no alvéolo está associada tanto à progressão da alveolite quanto à indução de iNOS, sendo, então, nosso objetivo verificar a associação desses fatores e sua interferência no reparo ósseo alveolar.

Assim sendo, este estudo visa elucidar o papel da iNOS no reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas e infecciosas, promovendo conhecimentos específicos que certamente contribuirão de forma significativa para futuras intervenções que previnam e tratem não só a alveolite como outras doenças ósseas de uma forma geral.

2 Proposição

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi esclarecer o papel da enzima iNOS no controle do reparo ósseo alveolar tanto em condições homeostáticas (reparo em condições normais) quanto infecciosas (alveolite experimental) em camundongos.

Mais especificamente, os objetivos deste estudo foram:

- Realizar a caracterização histológica (qualitativa) e histomorfométrica, (quantitativa) da cinética de reparo ósseo alveolar, em condições homeostáticas (controle) e infecciosas (alveolite experimental), em camundongos C57Bl/6 (WT) e as suas possíveis correlações com a cinética de expressão de iNOS ao longo do processo de reparo.
- Caracterizar o papel da enzima iNOS no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos, em condições homeostáticas e infecciosas, através da análise histomorfométrica e molecular do processo de reparo de forma comparativa entre camundongos das linhagens WT e iNOSKO.
- Analisar, do ponto de vista molecular, os possíveis papéis da enzima iNOS no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos, em condições homeostáticas e infecciosas, através da análise por RealTimePCR de alvos relacionados à resposta imunológica/inflamatória e diferentes marcadores ósseos de forma comparativa entre camundongos das linhagens WT e iNOSKO.

3 Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação

Foram utilizados, neste estudo, 135 camundongos C57Bl/6, com idade aproximada de 8 semanas, divididos em duas linhagens diferentes. O tipo selvagem (WT, C57Bl/6) cedido pelo biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP) e os animais da linhagem geneticamente deficiente (*knockout; KO*) para iNOS fornecidos pelo Centro de Criação de Animais Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP). Apenas camundongos machos foram utilizados para evitar influência das variações hormonais sobre o processo de reparo ósseo alveolar.

Os animais de cada linhagem foram igualmente divididos em 2 grupos, condição homeostática (grupos controles) e alveolite experimental, e analisados de acordo com os diferentes períodos experimentais (0, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia). Para as diferentes análises de cada grupo, em cada período, foram utilizados 5 animais para análise histomorfométrica e 4 para a análise molecular (RealTimePCR). Entretanto, não foi possível completar o grupo dos animais iNOKO, submetidos à alveolite experimental no período de 14 dias pós-exodontia, devido à dificuldade de obtenção dos mesmos.

Ambas as linhagens foram mantidas no biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, sob as mesmas condições. Todos os animais receberam alimentação líquida (água) e sólida (Ração Ativada Produtor - Anderson & Clayton S.A.). Os animais foram mantidos à temperatura de 23°C e período de claro-escuro de 12 horas. O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (CEEPA – Proc. Nº 024/2011); (ANEXO 1).

Tabela 1. Tabela de contingência contendo o número de animais de cada tempo por período experimental e por procedimento de análise a ser realizado

		Divisão dos Procedimentos				
		Histomorfometria		RealTime PCR		Total
Linhagem	Períodos	Condição Homeostática	Alveolite	Condição Homeostática	Alveolite	
C57bl/6-WT	0d	5	5	4	4	18
	7d	5	5	4	4	18
	14d	5	5	4	4	18
	21d	5	5	4	4	18
iNOSKO	0d	5	5	4	4	18
	7d	5	5	4	4	18
	14d	5	-	4	-	9
	21d	5	5	4	4	18
Total		40	35	32	28	135

3.2 Procedimentos cirúrgicos

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados, via intramuscular, com uma combinação de cloridrato de quetamina (15mg/kg - Dopalen®, Agribrans do Brasil LTDA) e xilasina (10mg/kg - Anasedan®, Agribrans do Brasil LTDA).

Após a antissepsia da área cirúrgica com iodo tópico (Dermoidine® - Gessy Lever Industrial Ltda.), o incisivo superior direito de cada animal foi extraído com a utilização de instrumentos adaptados para esse procedimento (OKAMOTO; DE RUSSO, 1973). Além disso, fez-se necessário o auxílio de um microscópio estereoscópico (DF Vasconcelos) nos aumentos de 16x e 25x (Figura 1).

Figura 1 - Camundongo da linhagem C57Bl/6-WT (a). Procedimento cirúrgico para realização da exodontia (b). Exodontia do incisivo superior direito (c). Alvéolo pós-exodontia (d).

3.3 Alveolite Experimental

Para a indução da alveolite experimental, foi provocada, inicialmente, isquemia no alvéolo do dente recém-extraído, introduzindo durante 1 minuto um cone de papel absorvente (Sybon-Kerr, segunda série) embebido em adrenalina a 1:1000 (Ariston Indústria Química Farmacêutica Ltda.). Após a retirada do cone, os animais permaneceram em observação por 60 a 90 segundos, com o objetivo de se comprovar a ausência de coágulo sanguíneo no interior do alvéolo.

Em seguida, foram utilizados cones de papel absorvente umedecidos em suspensão homogênea de secreção purulenta, fornecida pela Disciplina de Microbiologia da FOB-USP, e mantidos durante um minuto dentro do alvéolo. Essa suspensão foi obtida originalmente a partir de uma infecção alveolar induzida em

ratos, que foi coletada, adicionada a um meio de transporte e armazenada a -196°C (D'ANTONIO, 1984).

A utilização dessa suspensão, que contém os microrganismos *Capnocytophaga ochracea*, *Fusobacterium nucleatum ss nucleatum*, *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus anginosus*, *Treponema socranskii* e *Streptococcus sanguis*, previamente associados com quadros de infecções osteolíticas orais (BAUMGARTNER; XIA, 2003; D'ANTONIO, 1984; NITZAN; SPERRY; WILKINS, 1978; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005) permite a padronização da infecção, tendo sido utilizada com sucesso por nosso grupo de pesquisa anteriormente na indução de alveolite experimental em ratos (CARDOSO, 2009; RODRIGUES et al., 2011).

3.4 Coleta das amostras

Ao final de cada período experimental (0, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia), os animais foram sacrificados por dose excessiva de anestésico e suas maxilas foram coletadas utilizando um bisturi e lâmina nº15 (GARLET et al., 2007; GARLET et al., 2006).

Para a análise histomorfométrica de cada linhagem, foram analisados cinco camundongos de cada grupo (condição homeostática e alveolite) a cada tempo (0, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia), de acordo com estudos realizados por GARLET *et al.* (2006 e 2007). Essas amostras foram fixadas em solução de formalina a 10% (pH 7,2), armazenadas em temperatura ambiente e posteriormente lavadas em água corrente ("over-night").

Para a extração de RNA e posterior análise de expressão gênica, foram utilizados quatro camundongos de cada grupo, em cada período experimental. As amostras de tecido ósseo alveolar foram fragmentadas com auxílio de um cinzel, transferidas para um tubo "eppendorf" contendo Trizol (Invitrogen Life Technologies, EUA) e armazenadas a -70°C (GARLET et al., 2007; GARLET et al., 2006).

3.5 Procedimentos Histotécnicos

Após a fixação, as peças foram desmineralizadas em solução de pH 7,2 (solução contendo 4,13% de Titriplex III Merck® e 0,44% de hidróxido de sódio) a temperatura de 2 a 8°C, por um período aproximado de quarenta dias com trocas semanais da solução desmineralizadora e monitoramento por meio da análise radiográfica.

Após a desmineralização, as peças cirúrgicas foram lavadas em água corrente e imersas em água destilada por 24 horas visando à total remoção de EDTA. Em seguida, procedeu-se a desidratação da peça em soluções crescentes de etanol (um banho de etanol 70% por 24 horas, um banho de etanol 80% por 1 hora, um banho de etanol 90% por 1 hora, um banho de etanol 95% por 1 hora, dois banhos de etanol 100% por 1 hora, um banho de etanol 100% por 24 horas). As peças cirúrgicas previamente desidratadas foram acondicionadas em recipientes de vidro e submetidas à diafanização por meio de soluções de xilol (três banhos de uma hora). Posteriormente, as peças foram processadas e incluídas em parafina.

Os blocos foram submetidos a cortes longitudinais semi-seriados no sentido transversal com 5µm de espessura, com intervalo de 500µm abrangendo todas as regiões do alvéolo (cervical, média e apical), utilizando-se um micrótomo Leica Jung RM 2045. Em seguida, os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris e Eosina de Lison (LUNA, 1968). Todo o processo histológico foi realizado no laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

3.6 Análise histológica

A análise histológica qualitativa (descritiva) foi realizada utilizando-se um microscópio óptico binocular (OLYMPUS, modelo CH-2), com objetiva de aumento 40x. Inicialmente, procedeu-se a análise morfológica (morfologia) por meio de uma descrição subjetiva das porções cervical, média e apical do alvéolo nos diferentes períodos nos diferentes grupos.

A análise histológica quantitativa (histomorfométrica) foi realizada através da avaliação da densidade de volume das estruturas constituintes do tecido alveolar,

sendo que os critérios analisados foram: coágulo sanguíneo, infiltrado inflamatório, vasos, fibras, fibroblastos, matriz óssea, osteoblastos, osteoclastos e outros (espaço preenchido por líquido intersticial, medula óssea ou estruturas dentárias). A avaliação foi realizada através da análise microscópica, utilizando um microscópio óptico binocular (OLYMPUS, modelo CH-2), com objetiva de aumento 100x com o auxílio de um retículo de integração II ZEISS.

Casualização da amostra:

Foram obtidas 6 lâminas com 8 cortes semi-seriados de cada camundongo, realizando-se a análise histomorfométrica da 2^a, 4^a e 6^a lâmina e de 3 cortes de cada lâmina, aleatoriamente. Em cada corte, toda a região do alvéolo após a exodontia foi analisada, sendo o primeiro campo localizado abaixo do epitélio gengival e o último, próximo ao ápice da raiz.

Em cada alvéolo foram analisados trinta e nove campos microscópicos distintos, no aumento de 100x, 13 campos em cada terço do alvéolo (apical, médio e cervical), após randomização ou amostragem sistemática, na qual os campos foram escolhidos a intervalos regulares em cada corte, de maneira a se obter uma amostra representativa de toda área do corte (WEIBEL, 1969).

Determinação da densidade de volume:

Foi utilizada uma lente ocular de compensação ZEISS kpl 8x (Carl-Zeiss MicroImaging Inc.), contendo uma grade ou retículo de integração II ZEISS e uma objetiva de imersão com o aumento de 100x. O retículo de integração é composto por 10 linhas paralelas, divididas igualmente por 10 pontos, formando um sistema de 100 pontos equidistantes. A sobreposição do retículo sobre a imagem histológica permitiu a contagem de pontos presentes no retículo que coincidissem sobre as estruturas a serem analisadas (Figura 2).

O cálculo da densidade de volume (V_{vi}) foi obtido pela contagem de pontos coincidentes sobre as estruturas consideradas (P_i) e o número total de pontos existentes no retículo (P).

Figura 2 - Distribuição dos campos para análise de morfometria do alvéolo pós-exodontia (a) e retículo de integração sobre a imagem de um corte histológico (b).

CrITÉRIOS adotados na morfometria:

A análise histomorfométrica foi realizada de acordo com os seguintes critérios:

1. Coágulo.
2. Infiltrado inflamatório: foram incluídas neste critério células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares.
3. Vasos sanguíneos.
4. Fibras colágenas: foram consideradas fibras colágenas todas as fibras presentes no alvéolo devido ao marcante predomínio deste tipo de fibra. Além disso, a coloração utilizada (Hematoxilina-Eosina) não permite a diferenciação entre os tipos de fibras.
5. Fibroblastos.
6. Matriz óssea.
7. Osteoblastos.
8. Osteoclastos.
9. Outros: este critério inclui os espaços preenchidos por líquido intersticial, medula óssea ou estruturas dentárias.

Para cada animal, foram contabilizados 9 cortes somando os dados obtidos nas contagens para cada um dos critérios. O total de pontos ocupados pelo alvéolo foi considerado 100%. Em seguida, foi estabelecido o percentual ocupado por cada

uma das estruturas com os valores resultantes da contagem dos 9 cortes histológicos de cada animal. Calculou-se, então, a média e o desvio padrão dos percentuais obtidos nos animais pertencentes ao mesmo grupo.

3.7 Extração de RNA e Transcrição Reversa

Após a coleta da região anterior da maxila compreendendo a região do alvéolo dentário, a mesma foi fragmentada com auxílio de um cinzel (autoclavado e tratado com água DEPC), e transferida para um tubo tipo “eppendorf” contendo Trizol (Invitrogen Life Technologies, EUA).

Para extração do RNA total dos fragmentos foi utilizado reagente Trizol, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (Invitrogen Life Technologies, EUA), na proporção de 1ml de Trizol para cada 1mg de tecido, agitado por 30 segundos e mantido à temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1ml da suspensão foi adicionado 0,2ml de clorofórmio (Sigma) seguido de centrifugação a 12000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (camada superior) foi transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de isopropanol, agitado em “vortex” e incubado por 20 minutos a -20°C para precipitação do RNA da fase aquosa. Novamente os tubos foram centrifugados a 12000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em etanol 100%. Para permitir a secagem das amostras os tubos foram invertidos sobre um papel de filtro e deixados em temperatura ambiente por 5 minutos dentro de uma capela de fluxo laminar vertical (para impedir a contaminação das amostras).

Para redissolver o RNA total, as amostras foram suspensas em 50µl de água deionizada e livre de RNase, sendo então as amostras armazenadas a -70°C. Uma alíquota de 5µl foi utilizada para determinar a concentração de RNA/µl nas amostras, usando o aparelho GeneQuant (Pharmacia Amersham Biosciences, EUA). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa, com a utilização de uma transcriptase reversa (Kit de transcrição reversa - Superscript III, Invitrogen Life technologies) utilizando 5µg de RNA total; e tendo como volume final de reação 200µl.

3.8 Reações de RealTimePCR

A quantificação da expressão de mRNA (RNA mensageiro) codificando genes de marcadores do metabolismo ósseo (osteocalcina [OCN], fosfatase alcalina [ALP], colágeno tipo I [COL-I], RUNX2, proteína morfogenética óssea [BMP2], PHEX, DMP1, osteoprotegerina [OPG], cathepsina K [CTSK] e RANKL); citocinas (IL-10, TNF- α , IL-1 β e IL-6) e quimiocinas (CXCL1, CCL2, CCL5) foi realizada através de reações de RealTimePCR, utilizando o sistema SYBRGreen em um aparelho ABI5700 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), como previamente descrito (GARLET, 2005).

Conjuntos de primers e sondas adequados para cada uma das reações de amplificação foram identificados entre os sets inventoriados e previamente otimizados pelo fabricante (Applied Biosystems by Life Technologies). De forma geral, para as reações de RealTimePCR, foram utilizados 12,5 μ l do reagente TaqMan Master Mix (Applied Biosystems), 5 μ l da solução de cDNA (sintetizado como previamente descrito), 4 μ l de água MiliQ tratada com DEPC, e 1 μ l da solução contendo cada primer (a partir de uma solução stock, na qual cada primer se encontra na concentração de 1 μ g/ μ l, foram preparadas alíquotas de modo a ajustar a concentração ideal de primer a ser utilizada em cada reação para o volume de 1 μ l). A reação de amplificação compreendeu, basicamente, 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, além de um ciclo final de 20 minutos, com temperatura crescente de 60 a 95°C, empregada para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação.

O sistema utilizado (VIA7, Applied Biosystems by Life Technologies) realiza as reações de amplificação e detecção, e quantifica o nível de fluorescência gerado pelas sondas durante o processo de amplificação em cada ciclo, permitindo assim a quantificação relativa da expressão dos alvos selecionados. Os resultados foram analisados com base no valor de CT (cycle threshold ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado em relação ao nível de expressão de um gene constitutivo.

Todas as amostras também foram submetidas às reações para a detecção de RNA mensageiro para a beta-actina, um gene de expressão constitutiva, utilizado como controle positivo da reação de amplificação; assim como os níveis de expressão de beta-actina foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das sequências dos primers utilizados.

Para as reações de RealTimePCR, foram utilizadas, independentemente, amostras de cDNA provenientes do RNA extraído do tecido ósseo alveolar dos 4 animais de cada grupo, coletados de acordo com os tempos experimentais (0, 7, 14 e 21 dias pós-exodontia). Os resultados apresentados representaram os valores da média e desvio padrão, da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos dos 4 animais de cada período experimental. Um experimento representativo de três experimentos independentes.

3.9 Análise Estatística

Análises entre três ou mais tempos, como os dados relativos à análise histomorfométrica e os níveis de expressão de mRNA, foram submetidos ao teste estatístico de Análise de Variância one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tuckey. Para análises entre apenas dois tempos ou amostras, foi utilizado o teste t Student.

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

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da cinética de expressão da iNOS no processo de reparo ósseo alveolar:

Comparando os diferentes grupos em relação à expressão da enzima iNOS, observou-se maior expressão de mRNA de iNOS no período de 7 dias pós-exodontia no grupo WT-Alveolite (WT-A), quando comparado aos animais do grupo WT-Controle (WT-C; Figura 3; $p>0,05$), demonstrando o aumento de expressão de iNOS frente ao estímulo infeccioso. Como esperado, os animais iNOSKO não expressaram mRNA de iNOS, independente de sua condição (homeostática, alveolite) (Figura 3; $p>0,05$).

A análise dos resultados moleculares (RealTimePCR) demonstrou que mRNA expressando a enzima iNOS é significativamente expresso nos animais WT-C no tempos de 7, 14 e 21 dias (Figura 3) sendo que o pico de expressão se localiza no tempo de 7 dias. Um perfil similar de expressão de mRNA codificando iNOS pode ser observado nos animais WT submetidos ao protocolo de indução de alveolite experimental (WT-A; Figura 3), com significativa expressão de iNOS nos tempos de 7 (pico de expressão), 14 e 21 dias (Figura 3). Entretanto, quando comparados aos animais do grupo WT-C, os níveis de expressão de iNOS mRNA no grupo WT-A se mostraram significativamente aumentados no tempo de 7 dias, enquanto nos demais tempos experimentais a expressão em ambos os grupos se mostrou similar.

Figura 3 - **Cinética de expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 e iNOSKO em condições homeostáticas e submetidos à alveolite experimental.** Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) e modificados geneticamente para não expressarem iNOS (iNOSKO) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de iNOS foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD da intensidade de expressão de mRNA para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina, obtidos de 4 animais por grupo em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ entre os grupos WT-A e iNOSKO-A; # $p < 0,05$ entre os grupos WT-C e iNOSKO-C. ● Grupo WT- Controle; ▼ Grupo WT-Alveolite; ○ Grupo iNOSKO-Controle; ▽ Grupo iNOSKO-Alveolite.

4.2 Análise histológica comparativa da cinética do reparo ósseo alveolar pós-exodontia em camundongos WT e iNOSKO:

Para facilitar a compreensão dos resultados da análise histológica, demonstramos como as principais estruturas alveolares foram consideradas nos cortes histológicos (APÊNDICE A).

4.2.1 Camundongos WT (WT-Controle) e iNOSKO (iNOSKO-Controle) em condições homeostáticas:

Na análise do grupo WT-Controle (WT-C), verificamos, no momento inicial do processo de reparo ósseo (zero hora), a presença de grande quantidade de coágulo sanguíneo, sobretudo nas regiões cervical e média do alvéolo, diminuindo drasticamente nos períodos seguintes (Figura 4). Nos tempos de 7 e 14 dias observamos a formação de tecido conjuntivo que se apresentou dentro dos padrões de normalidade em relação às fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos (Figuras 4 e 5). Já no período de 21 dias pós-exodontia, as quantidades de fibras e fibroblastos foram menores quando comparadas aos períodos anteriores (7 e 14 dias). Tal observação demonstra a regressão do tecido conjuntivo acompanhado do aumento gradativo da área ocupada pelo tecido ósseo, o que pode ser reforçado pela maior concentração desse tecido observada nesse período, sobretudo na região média do alvéolo (Figura 5). Focos de infiltrado inflamatório foram detectados desde o início do processo de reparo (zero hora), com maior concentração durante o período de 7 dias pós-exodontia e regredindo nos demais períodos (14 e 21 dias). Os resultados observados seguem padrão similar nos terços cervical, médio e apical do alvéolo.

Em condições homeostáticas do processo de reparo ósseo alveolar, os animais iNOSKO-Controle (iNOSKO-C) apresentaram discretas diferenças na análise histológica quando comparados aos camundongos WT-C (Figuras 4 e 5). O grupo iNOSKO-C também apresentou alta concentração de coágulo sanguíneo no período inicial do reparo alveolar (zero hora), de maneira semelhante ao observado em todas as regiões do alvéolo. Posteriormente, observou-se uma alta quantidade de fibras colágenas e fibroblastos (7 e 14 dias) e por fim, a formação do tecido ósseo (21 dias). Focos de infiltrado inflamatório também foram detectados desde o início do processo de reparo ósseo (zero hora), porém esse grupo apresentou menor concentração de células inflamatórias no período de 7 dias pós-exodontia, quando

comparado ao grupo WT-C (Figura 4). Menor quantidade de osteoclastos foi observada nos períodos de 7 e 21 dias, porém, não foram observadas alterações evidentes nas quantidades de fibras, fibroblastos e tecido ósseo, quando comparamos o grupo iNOSKO-C ao grupo WT-C (Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Fotomicrografia de cortes histológicos obtidos da região média dos alvéolos de camundongos WT e iNOSKO em condições homeostáticas após exodontia nos períodos de 0 e 7 dias. HE, aumento 10x e 40x.

Figura 5 - Fotomicrografia de cortes histológicos obtidos da região média dos alvéolos de camundongos WT e iNOSKO em condições homeostáticas após exodontia nos períodos de 14 e 21 dias. HE, aumento 10x e 40x.

4.2.2 Camundongos WT (WT-Alveolite) e iNOSKO (iNOSKO-Alveolite) após indução da alveolite experimental:

Apesar da indução da alveolite experimental, tanto os animais WT-Alveolite (WT-A) quanto iNOSKO-Alveolite (iNOSKO-A), apresentaram cinética de reparo ósseo alveolar muito semelhante aos animais WT-C e iNOSKO-C, respectivamente. Assim, verificamos, no momento inicial do processo de reparo ósseo (zero hora), a presença de grande quantidade de coágulo sanguíneo, diminuindo drasticamente a partir do período de 7 dias pós-exodontia, em ambos os grupos. Também nos tempos de 7 e 14 dias, observamos a formação de tecido conjuntivo em ambos os grupos (Figura 6), caracterizada pela maior quantidade de fibras e fibroblastos. Posteriormente, observamos a regressão do tecido conjuntivo acompanhado do aumento gradativo da área ocupada pelo tecido ósseo (Figura 6). Os resultados observados seguem padrão similar nos terços cervical, médio e apical do alvéolo, nos dois grupos analisados.

Comparando o grupo iNOSKO-A ao grupo WT-A, observou-se maior concentração de células inflamatórias no período inicial do reparo ósseo (zero hora) no grupo iNOSKO-A (Figura 6). Resultado semelhante foi observado em relação às células ósseas, uma vez que o grupo iNOSKO-A apresentou maior concentração de osteoclastos e osteoblastos nos períodos de 7 e 21 dias pós-exodontia em relação aos animais WT-A (Figura 6). Quanto às demais estruturas analisadas, não foram observadas diferenças expressivas entre os grupos iNOSKO-A e WT-A, nos diferentes períodos experimentais (Figura 6).

Figura 6 - Fotomicrografia de cortes histológicos obtidos da região média dos alvéolos de camundongos WT e iNOSKO em condições infecciosas (alveolite experimental) após exodontia nos períodos de 0, 7 e 21 dias. HE, aumento 10x e 40x.

4.3 Análise histomorfométrica da densidade de volume de diferentes estruturas alveolares na cinética do reparo ósseo alveolar em camundongos WT e iNOSKO em condições homeostáticas e de alveolite experimental

Através da análise histomorfométrica, comparamos os diferentes grupos em relação à densidade de volume das seguintes estruturas alveolares: coágulo sanguíneo, infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos, fibras colágenas, fibroblastos, matriz óssea, osteoblastos, osteoclastos e outros (espaço preenchido por líquido intersticial, medula óssea ou estruturas dentárias) (Figuras 7 e 8).

Figura 7 - Densidade de volume das estruturas presentes no alvéolo dentário (%) nos camundongos WT e iNOSKO em condições homeostáticas (WT-C; iNOSKO-C) e alveolite experimental (WT-A; iNOSKO-A). Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados.

Figura 8 - Densidade de volume das estruturas presentes no alvéolo dentário (%) nos camundongos WT e iNOSKO em condições homeostáticas (WT-C; iNOSKO-C) e alveolite experimental (WT-A; iNOSKO-A). Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados.

A partir dos resultados obtidos pela análise histomorfométrica, a partir da qual pudemos comparar todos os grupos experimentais, focamos nossos resultados na análise comparativa entre os grupos WT-C e iNOSKO-C; WT-A e iNOSKO-A, a fim de investigarmos o papel da iNOS nas diferentes condições de reparo ósseo alveolar (homeostática e infecciosa).

4.3.1 Influência da iNOS na cinética do reparo ósseo alveolar em camundongos, em condições homeostáticas

Na análise comparativa entre os grupos WT-C e iNOSKO-C, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos apenas no período de 14 dias pós-exodontia, no qual os camundongos iNOSKO-C apresentaram maior densidade de volume de vasos sanguíneos, quando comparados aos animais WT-C (Figura 9; $p < 0,05$).

Além disso, observou-se uma tendência à menor densidade de volume de células inflamatórias no grupo iNOSKO-C, nos período de 7 dias pós-exodontia (Figura 9; $p > 0,05$). Resultado semelhante foi observado para os osteoclastos, os quais apresentaram menor densidade de volume nos animais iNOSKO-C, nos períodos de 7 e 21 dias pós-exodontia, quando comparados aos animais WT-C (Figura 9; $p > 0,05$). Já os osteoblastos apresentaram uma tendência à maior densidade de volume nos animais iNOSKO-C, no período de 7 dias pós-exodontia, quando comparados aos animais WT-C (Figura 9; $p > 0,05$).

Quanto às demais estruturas analisadas (coágulo, fibras, fibroblastos, matriz óssea e outros) não foram observadas diferenças significativas entre os grupos WT-C e iNOSKO-C (Figura 9; $p > 0,05$).

Figura 9 - Análise comparativa da densidade de volume das estruturas presentes no alvéolo dentário (%) nos camundongos WT e iNOSKO em condições homeostáticas (controle). Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. Diferença estatisticamente significativa só foi observada no período de 14 dias, em relação à densidade de volume dos vasos sanguíneos. * $p < 0,05$. ● Grupo WT- Controle; ○ Grupo iNOSKO-Controle.

4.3.2 Influência da iNOS na cinética do reparo ósseo alveolar em camundongos, na presença da alveolite

Comparando o grupo WT-A ao grupo iNOSKO-A, observamos, no período inicial do reparo ósseo alveolar (zero hora), quantidade significativamente maior de coágulo sanguíneo nos animais iNOSKO-A quando comparados aos animais WT-A (Figura 10; $p < 0,05$). Resultado semelhante foi observado em relação aos osteoblastos no período de 7 dias pós-exodontia, no qual os animais iNOSKO-A apresentaram maior densidade de volume de osteoblastos, quando comparados aos animais WT-A (Figura 10; $p < 0,05$). Já no período de 21 dias pós-exodontia, os camundongos iNOSKO-A apresentaram densidade de volume de osteoclastos significativamente maior em relação aos camundongos WT-A (Figura 10; $p < 0,05$).

Observou-se, também, uma tendência à maior densidade de volume de células inflamatórias nos animais iNOSKO-A, no período inicial do reparo ósseo alveolar (zero hora) e uma tendência à menor densidade de volume de fibras, no período de 7 dias pós-exodontia, quando comparados aos animais WT-A (Figura 10; $p > 0,05$). Quanto às demais estruturas analisadas (vasos sanguíneos, matriz óssea e outros) não foram observadas diferenças significativas entre os grupos WT-A e iNOSKO-A (Figura 10; $p > 0,05$).

Figura 10 - Análise comparativa da densidade de volume das estruturas presentes no alvéolo dentário (%) nos camundongos WT e iNOSKO em condições de alveolite experimental. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros: coágulo sanguíneo, no período de zero hora; osteoblastos, no período de 7 dias e osteoclastos, no período de 21 dias pós exodontia. * $p < 0,05$. ▼ Grupo WT- Alveolite; ▽ Grupo iNOSKO-Alveolite.

4.4 Análise da expressão de marcadores do metabolismo ósseo, marcadores de osteoclastos, quimiocinas e citocinas

Através da técnica de RealTimePCR, analisamos o perfil de expressão de marcadores do metabolismo ósseo (Figura 13) (osteocalcina [OCN], fosfatase alcalina [ALP], colágeno tipo I [COL1A1], RUNX2, proteína morfogenética óssea [BMP2], PHEX e DMP1), marcadores de osteoclastos (Figura 14) (osteoprotegerina [OPG], catepsina K [CTSK] e RANKL), quimiocinas (Figura 11) (CXCL1, CCL2 e CCL5); citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) (Figura 12), ao longo do processo de reparo alveolar pós-exodontia nas linhagens WT e iNOSKO, nas condições homeostática e de alveolite experimental.

De uma maneira geral, os quatro grupos analisados (WT-C, WT-A, iNOSKO-C e iNOSKO-A) apresentaram perfis de expressão gênica similares, durante o processo de reparo ósseo alveolar. Resumidamente, após a formação inicial do coágulo (zero hora), o fator de crescimento, BMP2, aumentou gradativamente, atingindo seu pico de expressão no período de 7 dias pós-exodontia nos grupos controles, e 14 dias nos animais WT-A. Posteriormente, houve o aparecimento transitório de focos de infiltrado inflamatório, associados com a citocina anti-inflamatória IL-10 e pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α que atingiram seu pico máximo no período de 7 dias pós-exodontia, assim como as quimiocinas CCL5 e CXCL1, enquanto a quimiocina CCL2 teve seu pico máximo no período de 14 dias pós-exodontia. Subsequentemente, o tecido de granulação foi gradualmente (7-21 dias pós-exodontia) substituído por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e tecido ósseo, estando tal processo associado à expressão de marcadores do metabolismo ósseo (COL1A1, OCN, ALP, RUNX2, PHEX e DMP1).

Para uma melhor compreensão dos resultados moleculares, descreveremos, com maiores detalhes, os resultados obtidos em cada grupo de genes analisados, comparando os resultados entre os grupos WT-C e iNOSKO-C; WT-A e iNOSKO-A.

4.4.1 Análise molecular da expressão de quimiocinas

Quimiocinas são membros de uma vasta família de pequenas proteínas solúveis que apresentam capacidade de controle de adesão, quimiotaxia e ativação leucocitária (GUERREIRO; SANTOS-COSTA; AZEVEDO-PEREIRA, 2011), são pequenas citocinas quimiotáticas que estimulam o recrutamento de células inflamatórias (AGGARWAL; GHOBRIAL; ROODMAN, 2006; SILVA et al., 2007). Tendo em vista a influência da iNOS na produção de quimiocinas e a potencial importância destas no processo de reparo ósseo alveolar, analisamos a expressão de quimiocinas pelos diferentes grupos estudados.

De uma maneira geral, observou-se maior expressão de CXCL1 e CCL5 no período de 7 dias pós-exodontia em todos os grupos analisados, enquanto a quimiocina CCL2 apresentou maior expressão no período de 14 dias pós-exodontia nos grupos WT-A, WT-C e iNOSKO-C. Em relação à expressão de mRNA de CXCL1, observou-se que os animais iNOSKO-A apresentaram níveis de expressão de CXCL1 significativamente maior que os animais WT-A, no período de 7 dias pós-exodontia (Figura 11; $p < 0,05$). No entanto, em condições homeostáticas, os animais WT-C apresentaram níveis de expressão de CXCL1 significativamente maior que os animais iNOSKO-C, no período de 7 dias pós-exodontia (Figura 11; $p < 0,05$). Os níveis de expressão de CCL2 apresentaram diferenças significativas entre os grupos WT-C e iNOSKO-C nos períodos de 7 e 14 dias pós-exodontia (Figura 11; $p < 0,05$), nos quais o grupo WT-C apresentou expressão significativamente mais elevada de mRNA de CCL2, quando comparado ao grupo iNOSKO-C. Por fim, analisando a expressão de CCL5, observamos que o grupo iNOSKO-A apresentou níveis de expressão significativamente mais elevados de mRNA de CCL5 quando comparado ao grupo WT-A, no período de 7 dias pós-exodontia (Figura 11; $p < 0,05$). De uma maneira geral, os animais submetidos à alveolite experimental (WT-A; iNOSKO-A) apresentaram uma tendência à maior expressão de quimiocinas quando comparados aos grupos controles (WT-C; iNOSKO-C) (Figura 11; $p > 0,05$).

Figura 11 - **Cinética de expressão de quimiocinas envolvidas no metabolismo ósseo no tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 e iNOSKO em condições homeostáticas e submetidos à alveolite experimental.** Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) e modificados geneticamente para não expressarem iNOS (iNOSKO) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de CXCL1, CCL2 e CCL5 foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD da intensidade de expressão de mRNA para os genes alvos, normalizados pela expressão da beta-actina, obtidos de 4 animais por grupo em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ entre os grupos WT-A e iNOSKO-A; # $p < 0,05$ entre os grupos WT-C e iNOSKO-C. ● Grupo WT- Controle; ▼ Grupo WT-Alveolite; ▽ Grupo iNOSKO-Controle; ○ Grupo iNOSKO-Alveolite.

4.4.2 Análise molecular da expressão de citocinas

As citocinas são polipeptídeos secretados por células da imunidade natural e adquirida em resposta a microrganismos e outros antígenos, que medeiam e regulam reações imunológicas e inflamatórias (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Sabendo da importância dessas moléculas no processo de reparo ósseo alveolar, nosso próximo passo foi analisar a expressão de diferentes citocinas anti- e pró-inflamatórias durante os diferentes períodos do reparo ósseo.

A expressão de mRNA de IL-10 foi significativamente maior no grupo iNOSKO-C quando comparado ao grupo WT-C, nos períodos de 7 e 14 dias pós-exodontia (Figura 12; $p < 0,05$). Já os grupos WT-A e iNOSKO-A não apresentaram diferença significativa nos níveis de expressão de IL-10, durante os diferentes períodos de reparo ósseo alveolar (Figura 12; $p > 0,05$).

A análise de expressão das citocinas pró-inflamatórias revelaram resultados variáveis. Os níveis de expressão de TNF- α foram significativamente maiores nos grupos WT-A e WT-C, quando comparados aos grupos iNOSKO-A e iNOSKO-C, respectivamente, no período de 7 dias pós-exodontia (Figura 12; $p < 0,05$). O mesmo foi observado em relação à expressão de IL-1 β pelos grupos controles. Os animais WT-C apresentaram expressão significativamente mais elevada de mRNA de IL-1 β , no período de 7 dias pós-exodontia, quando comparados aos animais iNOSKO-C (Figura 12; $p < 0,05$). Não houve diferença significativa na expressão de IL-1 β entre os grupos infectados (WT-A e iNOSKO-A) (Figura 12; $p > 0,05$). Por fim, comparando os diferentes grupos em relação aos níveis de expressão de mRNA de IL-6, não observamos diferença significativa entre eles (Figura 12; $p > 0,05$).

Figura 12 - **Cinética de expressão de citocinas no tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 e iNOSKO em condições homeostáticas e submetidos à alveolite experimental.** Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) e modificados geneticamente para não expressarem iNOS (iNOSKO) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de IL-10, IL-1β, IL-6 e TNF-α foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD da intensidade de expressão de mRNA para os genes alvos, normalizados pela expressão da beta-actina, obtidos de 4 animais por grupo em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ entre os grupos WT-A e iNOSKO-A; # $p < 0,05$ entre os grupos WT-C e iNOSKO-C. ● Grupo WT- Controle; ▼ Grupo WT-Alveolite; ○ Grupo iNOSKO-Controle; ▽ Grupo iNOSKO-Alveolite.

4.4.3 Análise molecular da expressão de marcadores do metabolismo ósseo

Analisando a expressão do fator de crescimento BMP2, observou-se uma tendência à maior expressão de mRNA de BMP2 nos grupos WT-C e iNOSKO-C, quando comparados aos animais submetidos à alveolite experimental (WT-A e iNOSKO-A), respectivamente, porém não houve diferença significativa entre os animais WT e iNOSKO, sob as mesmas condições (Figura 13; $p>0,05$). Resultado similar foi observado em relação à análise da expressão do marcador de matriz COL1A1. Não houve diferença significativa na expressão de COL1A1 quando comparamos os animais WT-C aos animais iNOSKO-C (Figura 13; $p>0,05$) e também não houve diferença significativa entre os grupos WT-A e iNOSKO-A (Figura 13; $p>0,05$). Porém, quando comparamos os animais controles (WT-C e iNOSKO-C) aos seus respectivos grupos submetidos à alveolite experimental (WT-A e iNOSKO-A), podemos observar uma tendência a maior expressão de COL1A1 nos animais controles (WT-C; iNOSKO-C), sobretudo, nos períodos de 7 e 14 dias pós-exodontia (Figura 13; $p>0,05$).

Em relação à análise da expressão dos diferentes marcadores ósseos, o grupo iNOSKO-C apresentou expressão de mRNA de RUNX2 significativamente maior quando comparado ao grupo WT-C, no período de 7 dias pós-exodontia (Figura 13; $p<0,05$). Não houve diferença significativa na expressão de RUNX2 entre os grupos, nos demais períodos analisados (Figura 13; $p>0,05$).

Através da análise da expressão de fosfatase alcalina (ALP), responsável pela mineralização do tecido ósseo em formação, não foi observada diferença significativa entre os animais dos diferentes grupos, em nenhum período experimental (Figura 13; $p>0,05$). Resultados similares foram observados em relação aos demais marcadores do metabolismo ósseo. A expressão de osteocalcina (OCN), marcador dos estágios mais avançados da diferenciação celular dos osteoblastos, não apresentou diferença significativa entre os grupos analisados (Figura 13; $p>0,05$), assim como a expressão de DMP1, fosfoproteína ácida da matriz dentinária, crítica para a mineralização adequada do tecido ósseo e dentinário (Figura 13; $p>0,05$). Outra proteína envolvida na mineralização da matriz óssea é a proteína codificada pelo gene PHEX. Analisando a expressão de mRNA de PHEX, não observamos diferença significativa entre os grupos analisados (Figura 13; $p>0,05$), nos diferentes períodos de reparo ósseo alveolar.

Figura 13 - Cinética de expressão de marcadores do metabolismo ósseo no tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 e iNOSKO em condições homeostáticas e submetidos à alveolite experimental. Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) e modificados geneticamente para não expressarem iNOS (iNOSKO) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de COL1A1, BMP2, RUNX2, ALP, OCN, DMP1 e PHEX foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD da intensidade de expressão de mRNA para os genes alvos, normalizados pela expressão da beta-actina, obtidos de 4 animais por grupo em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ entre os grupos WT-A e iNOSKO-A; # $p < 0,05$ entre os grupos WT-C e iNOSKO-C. ● Grupo WT- Controle; ▼ Grupo WT-Alveolite; ○ Grupo iNOSKO-Controle; ▽ Grupo iNOSKO-Alveolite.

4.4.4 Análise molecular da expressão de marcadores de osteoclastos

Estando os marcadores de osteoclastos diretamente associados à função e ativação dessas células e, conseqüentemente, à reabsorção óssea, consideramos de extrema importância analisar a expressão desses fatores durante o processo de reparo ósseo alveolar.

Analisando a expressão de RANKL, observou-se maior expressão de mRNA de RANKL nos grupos WT-C e iNOSKO-A quando comparados aos grupos WT-A e iNOSKO-C, respectivamente, no período de 7 dias pós-exodontia (Figura 14; $p < 0,05$). No período de 14 dias pós-exodontia, observou-se diferença significativa apenas entre os grupos WT-C e iNOSKO-C, sendo que os animais WT-C apresentaram níveis de expressão de RANKL mais elevados quando comparados aos animais iNOSKO-C (Figura 14; $p < 0,05$). Já no período de 21 dias pós-exodontia, foram os grupos WT-A e iNOSKO-A que apresentaram níveis de expressão de RANKL significativamente diferentes. Nesse caso, os níveis de expressão de mRNA foram mais elevados no grupo iNOSKO-A em relação ao grupo WT-A (Figura 14; $p < 0,05$). A expressão de mRNA de OPG não apresentou diferença significativa entre os grupos analisados, nos diferentes períodos de reparo ósseo alveolar (Figura 14; $p > 0,05$).

Por fim, analisamos a expressão do marcador de osteoclastos, catepsina K (CTSK), e observamos diferença significativa nos níveis de expressão desse marcador entre os grupos WT-A e iNOSKO-A (Figura 14; $p < 0,05$). No período de 7 dias pós-exodontia, o grupo iNOSKO-A apresentou níveis de expressão de CTSK mais elevados quando comparado ao grupo WT-A (Figura 14; $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos demais períodos analisados (Figura 14; $p > 0,05$).

Figura 14 - Cinética de expressão de marcadores de osteoclastos no tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 e iNOSKO em condições não infecciosas e submetidos à alveolite experimental. Amostras do tecido alveolar de camundongos C57Bl/6 (WT) e modificados geneticamente para não expressarem iNOS (iNOSKO) foram coletadas, o RNA total extraído e os níveis de expressão de RANKL, OPG e CTSK foram analisados por RealTimePCR. Os resultados apresentados representam os valores da média $\pm$ SD da intensidade de expressão de mRNA para os genes alvos, normalizados pela expressão da beta-actina, obtidos de 4 animais por grupo em cada tempo. Um experimento representativo de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ entre os grupos WT-A e iNOSKO-A; # $p < 0,05$ entre os grupos WT-C e iNOSKO-C. ● Grupo WT- Controle; ▼ Grupo WT-Alveolite; ○ Grupo iNOSKO-Controle; ▽ Grupo iNOSKO-Alveolite.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

O processo de reparo ósseo alveolar é uma resposta fibroproliferativa, mediada por fatores de crescimento e citocinas, cujo objetivo é restaurar o tecido ao seu estado original. Trata-se de um processo complexo que envolve uma sequência de eventos, tendo seu início marcado pela inflamação em resposta a uma lesão não infecciosa inicial ao tecido (COTRAN et al., 1996). Mesmo em condições consideradas não-infecciosas, mecanismos inflamatórios são extremamente importantes no processo de reparo ósseo, e acredita-se que esses mecanismos atuem de forma decisiva no processo de angiogênese, formação e remoção do tecido de granulação e na subsequente formação do tecido ósseo (CARANO; FILVAROFF, 2003; CARDOSO, 2009; KANCZLER; OREFFO, 2008; KANYAMA et al., 2003; POLETI, 2009; RODRIGUES, 2007; WEISS et al., 2009). Resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa demonstraram que citocinas com potentes ações pró- e anti-inflamatórias também são expressas, e estão potencialmente envolvidas na regulação do processo de reparo ósseo alveolar tendo em vista recentes descobertas no campo da osteoimunologia (CARDOSO, 2009; RODRIGUES, 2007).

Alterações patológicas, entretanto, podem alterar a resposta do hospedeiro e influenciar de forma marcante o processo de reparo ósseo alveolar (BLUM, 2002; CARDOSO, 2009; NOROOZI; PHILBERT, 2009; RODRIGUES, 2007; TORRES-LAGARES et al., 2005). Exemplo disso é a alveolite, condição inflamatória causada por trauma ou infecção, que caracteristicamente se mostra associada a uma intensa resposta inflamatória e imunológica local, assim como a uma significativa interferência no processo de reparo alveolar (BLUM, 2002). De fato, processos infecciosos têm sido associados à potencialização da reabsorção óssea e diminuição do processo de osteogênese; e também associados a um prognóstico negativo do processo de reparo tecidual em geral (ALBANI et al., 2011; BROWN; JOSSE, 2002; GOLDRING, 2000; RACHNER; KHOSLA; HOFBAUER, 2011). Nesse contexto, acredita-se que os produtos microbianos atuem basicamente como estímulo para exacerbação e cronificação da resposta inflamatória e imunológica

local, e por sua vez, mediadores de tal resposta seriam os responsáveis pela interferência no processo de reparo.

Dessa forma, diversos mediadores da resposta inflamatória e imunológica podem estar envolvidos no processo de reparo ósseo apresentando papel construtivo, assim como destrutivo; entretanto os exatos mecanismos que determinam a natureza dessa dualidade permanecem desconhecidos.

Dentre os mediadores potencialmente envolvidos neste processo, o óxido nítrico e a enzima iNOS, diretamente envolvida na sua produção, coincidentemente têm sido descritos como moléculas que apresentam um duplo papel podendo atuar tanto estimulando como também inibindo os processos de formação e reabsorção óssea (BRANDI et al., 1995; LOWIK et al., 1994; MACINTYRE et al., 1991; RALSTON et al., 2009).

Tendo em vista estas possíveis atuações da enzima iNOS e, conseqüentemente, do NO no processo de reparo ósseo, este estudo teve por objetivo caracterizar a função da iNOS no reparo ósseo alveolar em camundongos pós-exodontia tanto em condições homeostáticas (não infecciosas) quanto em condições infecciosas (alveolite experimental).

Sendo assim, nosso primeiro passo foi analisar a cinética de expressão da iNOS durante o reparo ósseo alveolar, pelos diferentes grupos experimentais. Como esperado, os animais iNOSKO não expressaram tal enzima em nenhum momento do processo de reparo, independente de sua condição (homeostática; alveolite). Já os camundongos WT, apresentaram maior expressão de iNOS quando submetidos à alveolite experimental, em relação à condição controle.

A partir desses achados, buscamos definir quais os possíveis fatores estariam envolvidos na indução da expressão de iNOS observada em cada situação. O fato do grupo WT-A ter sido submetido à alveolite experimental fez com que a expressão de iNOS fosse maior, quando comparado ao grupo WT-C. De fato, estudos demonstram que enquanto os níveis de proteína iNOS são baixos ou ausentes em células não estimuladas, como é o caso do reparo ósseo homeostático, a expressão de iNOS aumenta rapidamente em experimentos *in vitro* ou *in vivo* após exposição a estímulos pró-inflamatórios que incluem LPS, TNF- α , IL-1 β , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , ou hipóxia (COX et al., 1992; NATHAN; XIE, 1994), como observado no modelo de alveolite experimental. De maneira semelhante a outros tecidos, no osso, a expressão de iNOS também pode ser induzida por lipopolissacarídeos bacterianos

(LPS), citocinas pró-inflamatórias e interferons (VAN'T HOF; RALSTON, 2001). Além disso, em um processo normal de reparo, como é o caso do reparo ósseo alveolar, os níveis de NO apresentam-se relativamente baixos quando comparados aos de uma infecção ou presença de epítomos microbianos (REPEKE et al., 2010), uma vez que, a presença de produtos microbianos ativa células residentes e inflamatórias levando à produção de mediadores inflamatórios e antimicrobianos, tais como o óxido nítrico (NO). Já na condição controle, os animais WT estariam produzindo iNOS pelo próprio estímulo mecânico, causado pelo trauma da exodontia. De fato, estudos demonstram que a maioria das células pode ser induzida a produzir iNOS em resposta à estimulação com citocinas e/ou endotoxinas, por estimulação mecânica ou criação de uma fratura (KOMATSU; HADJIARGYROU, 2004; RALSTON, 1997; RALSTON; GRABOWSKI, 1996; VAN'T HOF; RALSTON, 1997; WATANUKI et al., 2002).

Ainda em relação aos resultados da cinética de expressão da iNOS no processo de reparo ósseo alveolar, observamos que, apesar da diferença na quantidade de expressão da iNOS pelos grupos WT-A e WT-C, a cinética de expressão foi semelhante nos dois grupos, caracterizada por um pico de expressão da enzima no período de 7 dias pós-exodontia, seguido por rápido declínio, nos períodos seguintes (Figura 3).

Partindo desses resultados, delimitamos o objetivo do presente estudo, buscando caracterizar o papel da iNOS no processo de reparo ósseo alveolar, em condições homeostáticas e infecciosas. Para isso, fez-se necessário a definição da metodologia mais apropriada e a utilização de animais modificados geneticamente para não expressarem iNOS. Cronologicamente, o modelo de reparo ósseo alveolar em camundongos assemelha-se, muito, com outros modelos experimentais, em especial com o reparo alveolar humano, pós-exodontia. Resultados (histológicos e histomorfométricos) preliminares de nosso modelo em camundongos demonstraram que o processo de reparo ósseo alveolar apresenta a mesma sequência de eventos previamente descrita em humanos e ratos (BODNER et al., 1993; CARDOSO, 2009; ELSUBEIHI; HEERSCHKE, 2004; POLETI, 2009; RODRIGUES, 2007) apresentando apenas uma variação na cronologia do processo de reparo, característica do metabolismo murino (BODNER et al., 1993; KORPI et al., 2009; WITTE; BARBUL, 1997). Em humanos, a conclusão do reparo alveolar ocorre por volta do sétimo mês (64 dias) após a exodontia (CARVALHO; OKAMOTO, 1987). Nos modelos

experimentais, este evento ocorre aproximadamente após 28 dias em ratos (BODNER et al., 1993; CARDOSO, 2009; ELSUBEIHI; HEERSCHKE, 2004; POLETI, 2009; RODRIGUES, 2007) e 21 dias em camundongos (resultados preliminares).

Além disso, camundongos apresentam custo relativamente baixo, são de fácil manejo e os processos inflamatórios e imunológicos são extensamente estudados e bem conhecidos. Seu “*background*” genético é conhecido e manipulável, permitindo que aspectos muito bem definidos possam ser avaliados de maneira precisa, através da geração de animais geneticamente modificados, ou da utilização de substâncias bloqueadoras ou antagonistas, que em sua grande maioria são desenvolvidas experimentalmente em camundongos (GENCO; VAN DYKE; AMAR, 1998). O modelo proposto neste estudo também nos permite a indução da infecção experimental dos alvéolos, mimetizando um quadro de alveolite, que permite ampliar o foco de investigação para a influência de condições inflamatórias e infecciosas – que caracteristicamente resultam em exacerbada resposta imune e inflamatória local, no processo de reparo ósseo alveolar (BLUM, 2002; NOROOZI; PHILBERT, 2009; TORRES-LAGARES et al., 2005).

Ainda em relação à metodologia utilizada nesse estudo, é unânime na literatura a análise microscópica neste tipo de metodologia para o estudo do reparo ósseo alveolar. Porém, com os adventos da biologia molecular e o acesso a equipamentos e produtos financiados por empresas de auxílio pecuniário, também foi possível o estudo do processo de reparo alveolar e da alveolite experimental, através da técnica de RealtimePCR. Sendo um recurso prático e rápido, o interesse em validar esse tipo de análise no estudo de reparo tecidual alveolar é grande, em relação ao grande tempo de processamento histotécnico e análise histomorfométrica, necessário para a análise microscópica. Na microscopia é possível visualizar o que está ocorrendo, quantificar e qualificar as estruturas. Já, a análise molecular permite obter a expressão do gene que comanda a produção dessas estruturas; portanto deve haver uma correlação entre a expressão desses genes e a presença dessas estruturas. Sendo assim, foram selecionados alguns fatores que atuam no metabolismo ósseo e reparo alveolar, como: colágeno tipo I, BMP2, osteocalcina, fosfatase alcalina, RUNX2, DMP1, PHEX, RANKL, OPG, catepsina K, além de quimiocinas e citocinas, como: CXCL1, CCL2, CCL5, IL-10, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , no intuito de correlacioná-los com as estruturas que foram

observadas microscopicamente relacionadas ao coágulo, infiltrado inflamatório, tecido conjuntivo e tecido ósseo.

A partir da análise comparativa entre os resultados histomorfométricos e moleculares, sobretudo em relação à cinética de expressão da iNOS, foi possível, além de determinar o papel da iNOS no processo de reparo ósseo, inferir como a quantidade disponível dessa enzima poderia interferir no reparo, uma vez que, em condições homeostáticas a expressão de iNOS foi relativamente baixa, quando comparada à condição infecciosa. De fato, estudos demonstram que doses crescentes de NO derivado da iNOS podem potencializar citocinas da inflamação que podem interferir diretamente nos processos de formação e reabsorção ósseas (ARMOUR et al., 1999; ARMOUR et al., 2001; VAN'T HOF et al., 2000; VAN'T HOF; RALSTON, 2001), sugerindo que o NO pode ser prejudicial a elevadas e sustentadas doses.

Porém, observamos que, apesar dessa diferença na quantidade de expressão da iNOS pelos grupos WT-A e WT-C, tanto em condições homeostáticas (WT-C vs iNOSKO-C) quanto infecciosas (WT-A vs iNOSKO-A), as variações observadas durante o processo de reparo ósseo alveolar foram discretas e pontuais em ambas situações. Além disso, através dos resultados histomorfométricos, foi possível comparar todos os grupos em relação à densidade de volume das diferentes estruturas alveolares (Figuras 7 e 8) e observar que entre os grupos WT-C e WT-A; iNOSKO-C e iNOSKO-A as variações nas estruturas alveolares durante o processo de reparo foram ainda mais discretas. Por fim, a caracterização morfométrica e molecular do processo de reparo ósseo alveolar já foram devidamente/previamente descritas nos animais WT, em estudos anteriores de nosso laboratório (VIEIRA, 2013), fazendo com que delimitássemos nosso estudo na comparação entre os grupos WT-C e iNOSKO-C; WT-A e iNOSKO-A.

Assim sendo, discutiremos na sequência as principais variações observadas entre os grupos WT-C e iNOSKO-C; WT-A e iNOSKO-A durante o processo de reparo ósseo alveolar e, posteriormente, as possíveis razões para essas discretas variações.

Nossos resultados histomorfométricos demonstraram menor quantidade de células inflamatórias nos animais iNOSKO-C no período de 7 dias pós-exodontia quando comparados aos animais WT-C. Porém, na alveolite, onde pudemos observar elevada expressão de iNOS, sobretudo no período de 7 dias pós-

exodontia, os animais iNOSKO-A apresentaram uma tendência ao maior número de células inflamatórias no período inicial do reparo (zero hora) quando comparados aos animais WT-A. Assim, nossos resultados sugerem que em pequena quantidade (WT-C) iNOS parece apresentar importante papel inflamatório no processo de reparo ósseo alveolar, já quando presente em elevada quantidade (WT-A), iNOS parece ser responsável por uma resposta inflamatória “imediate”.

Apesar da relação direta da iNOS com diversos mediadores inflamatórios, como é o caso das citocinas TNF- α e IL-1 β , que direta e indiretamente promovem a migração de células inflamatórias, camundongos iNOSKO *shan-infectados*, ou seja, camundongos que não sofreram indução de uma determinada bactéria, apresentam níveis muito semelhantes de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no soro sanguíneo em relação a camundongos WT. Desta forma, a ausência de iNOS, em modelos não infecciosos, pouco alteraria a migração de leucócitos. De fato, apesar dos nossos resultados demonstrarem uma tendência ao maior número de células inflamatórias pelos animais iNOSKO-C no período de 7 dias pós-exodontia, não observamos diferença significativa em relação à densidade de volume do infiltrado inflamatório nos diferentes períodos analisados. A análise molecular dos níveis de expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias confirmaram nossos achados histomorfométricos. Analisando a expressão de IL-10, TNF- α , IL-6 e IL-1 β , observamos diferença estatisticamente significativa nos níveis de expressão de IL-10, IL-1 β e TNF- α entre os grupos WT-C e iNOSKO-C apenas no período de 7 dias pós-exodontia. Resultados semelhantes foram observados em relação à análise de quimiocinas, onde a expressão de CXCL1 e CCL2 foi significativamente maior nos animais WT-C, no período de 7 dias, confirmando assim, o papel inflamatório da iNOS, durante o processo de reparo ósseo homeostático.

Na alveolite experimental, no entanto, observamos uma tendência ao maior número de células inflamatórias nos animais iNOSKO-A no período inicial do reparo ósseo alveolar (zero hora) quando comparados aos animais WT-A, porém nos demais períodos, observamos maior quantidade de células inflamatórias nos animais WT-A, demonstrando importante papel inflamatório da iNOS também nessa situação.

Analisando os níveis de expressão de citocinas, observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos WT-A e iNOSKO-A apenas na expressão de TNF- α , no período de 7 dias pós-exodontia. Sabe-se que a presença de produtos microbianos ativa células residentes e inflamatórias, levando à produção de

mediadores inflamatórios, tais como TNF- α , que estimula a migração de células inflamatórias ao local da infecção, resultando em maior densidade de infiltrado inflamatório (DE OLIVEIRA et al., 2009; GARLET et al., 2005; GARLET et al., 2007; NOWZARI et al., 2008). Dessa forma, TNF- α desempenha papel crítico na resistência a infecção por diversos patógenos, contribuindo tanto para respostas imunes inatas quanto adaptativas. Esta citocina atua em diversos passos nos mecanismos de recrutamento de leucócitos, induzindo o aumento da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e em leucócitos; e estimulando a produção local de quimiocinas, que por sua vez, atuam na manutenção e/ou na amplificação da reação inflamatória local (GRAVES; COCHRAN, 2003; GRAVES; JIANG, 1995; JIANG; MAGLI; RUSSO, 1999; NOWZARI et al., 2008; OFFENBACHER et al., 1989). Embora TNF- α apresente papel essencial na iniciação e efetuação das respostas imune e inflamatória, diversos estudos têm demonstrado que a expressão inadequada de tal citocina pode levar a um significativo dano colateral ao hospedeiro. De fato, TNF- α apresenta evidente papel na patogênese de diversas doenças autoimunes e inflamatórias com comprometimento ósseo, como a artrite reumatóide e as doenças periodontais (DINARELLO, 2000; GARLET et al., 2007; GILBERT et al., 2000; HENDERSON; NAIR, 2003; RAUNER; SIPOS; PIETSCHMANN, 2007; RIDDERSTAD; ABEDI-VALUGERDI; MOLLER, 1991; STASHENKO et al., 1987).

Na fase inicial do reparo alveolar, a expressão de TNF- α é significativa, em decorrência ao estímulo da exodontia, sendo ainda maior nos alvéolos infectados (CARDOSO, 2009; RODRIGUES, 2007). De fato, nossos resultados demonstraram maior produção de TNF- α nos animais submetidos à alveolite experimental, sobretudo no início do processo de reparo ósseo.

Adicionalmente, TNF- α apresenta efeitos marcantes sobre as células ósseas. Estando a maior produção de NO por iNOS diretamente associada a maior expressão de TNF- α durante um quadro de infecção, pode-se dizer, então, que os efeitos de TNF- α refletem indiretamente, os efeitos de NO no processo de reparo ósseo alveolar. Dessa forma, TNF- α reduz a formação óssea, atuando nas células precursoras dos osteoblastos, regulando, por exemplo, a expressão de RUNX2, inibindo assim a diferenciação osteoblástica (DRESNER-POLLAK et al., 2004; GILBERT et al., 2002; HERMAN; KRONKE; SCHETT, 2008; LACEY et al., 2009). Além disso, TNF- α também atua sobre osteoblastos maduros, inibindo a síntese de

osteocalcina e proteínas da matriz, como o colágeno tipo I (GILBERT et al., 2000; GILBERT et al., 2002). Sugere-se, ainda, que TNF- α atue como um potente fator pró-apoptótico através da sinalização do ligante Fas-Fas (FasL), regulando a apoptose de osteoblastos (BEHL et al., 2008; LEE et al., 2008). Além de sua atuação sobre os osteoblastos, o TNF- α também atua sobre os osteoclastos, aumentando a reabsorção óssea. Assim, a perda óssea inflamatória é resultado da ação de TNF- α sobre osteoblastos e osteoclastos (BEHL et al., 2008; GILBERT et al., 2000; GILBERT et al., 2002; HERMAN; KRONKE; SCHETT, 2008; KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; LACEY et al., 2009; LEE et al., 2008). TNF- α ainda induz a mobilização de células precursoras de osteoclastos (monócitos) da medula óssea e sua migração para sítios de inflamação onde TNF- α , junto com o RANKL, facilita a fusão dos monócitos, resultando nos osteoclastos que reabsorvem a matriz óssea (BEHL et al., 2008; HERMAN; KRONKE; SCHETT, 2008; KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; LEE et al., 2008; LORENZO; HOROWITZ; CHOI, 2008). Apesar desses achados, nossos resultados não demonstraram alterações ósseas significativas associadas a maior expressão de TNF- α pelos camundongos WT submetidos à alveolite experimental.

Outro aspecto importante dessa citocina é sua capacidade de ativar macrófagos e conseqüentemente sua ação microbicida via iNOS/NO (LEENEN et al., 1994; SILVA; MACHADO; MARTINS, 2003; SOUTO et al., 2000). Além disso, no processo de controle de infecção por micobactérias, TNF- α parece ter um papel primordial, atuando numa grande variedade de células. As principais células produtoras de TNF- α são macrófagos ativados, linfócitos T e células dendríticas (BARNES et al., 1993; LADEL et al., 1997; SERBINA; FLYNN, 1999). Esta citocina age em sinergia com IFN- γ , estimulando a produção de intermediários reativos de nitrogênio (RNIs), dentre os quais, destaca-se o NO, mediando a função de macrófagos na tuberculose (MOHAN et al., 2001; SCANGA et al., 2000; YU et al., 1999). TNF- α também estimula a migração de células do sistema imune para o local da infecção, contribuindo para a formação de granulomas, capaz de controlar a progressão da doença (MOHAN et al., 2001).

Além de TNF- α , outras citocinas e quimiocinas estão presentes no processo inflamatório e podem influenciar, diretamente, o reparo ósseo em condições infecciosas. Em modelos experimentais de inflamação pulmonar em camundongos iNOSKO, os níveis da quimiocina MIP-2, quimioatrativa de células

polimorfonucleares permanecem similares quando comparados aos camundongos WT (ZEIDLER et al., 2004). Por outro lado, em modelo experimental de lesão periapical, camundongos iNOS $-/-$ expressaram níveis mais elevados de IL-1 β , TNF- α , RANK, RANKL e MCP-1 em relação aos camundongos C57Bl/6 e, a progressão da lesão periapical nesses animais (iNOS $-/-$) foi relacionada a um desequilíbrio de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), moduladores de reabsorção óssea (RANK e RANKL) e MCP-1 (SILVA et al., 2011). Em nosso modelo experimental, entretanto, quando comparamos os camundongos WT aos camundongos iNOSKO em condições infecciosas (alveolite experimental), não observamos diferença significativa nos níveis de expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 e anti-inflamatória IL-10.

Sabe-se que o recrutamento de células inflamatórias também está diretamente associado à maior expressão de quimiocinas. Em modelo experimental de lesão muscular em camundongos, observou-se que iNOS modula o recrutamento de células inflamatórias, apresentando papel crítico na regeneração muscular. Músculos danificados de animais iNOSKO expressavam níveis significativamente mais elevados de quimiocinas como MIP2, MCP1, MIP-1a, e MCP1, e exibiam mais neutrófilos infiltrantes após a lesão e persistência de macrófagos em períodos mais tardios (RIGAMONTI et al., 2013). Além disso, vários estudos indicam que o NO derivado da iNOS é um importante regulador homeostático de recrutamento de leucócitos na inflamação, sugerindo que uma de suas funções é atuar como uma molécula anti-inflamatória endógena durante a inflamação contínua (HICKEY et al., 1997). Assim, em vários modelos inflamatórios, camundongos deficientes de iNOS apresentam dificuldade na resolução da inflamação (MCCAFFERTY et al., 1997). De fato, nossos resultados moleculares mostraram maior expressão de quimiocinas pelos animais iNOSKO, em condições infecciosas. Esses resultados podem estar diretamente relacionados à maior concentração de células inflamatórias nesses animais no início do processo de reparo, quando comparados aos camundongos WT na alveolite.

Ainda em relação aos fatores associados ao foco de infiltrado inflamatório, analisamos a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10. Tal citocina está geralmente associada a uma redução significativa na reação inflamatória, mas uma vez que interfere na resposta imune celular mediada por TNF- α e IFN- γ , a produção de IL-10 pode prejudicar a eliminação de agentes infecciosos, levando a latência de

infecções. As propriedades regulatórias de IL-10 também incluem a inibição da produção de fatores osteoclastogênicos, além de estimular a produção de seus respectivos antagonistas (GARLET, 2004). Além disso, IL-10 tem importantes efeitos sobre as células ósseas, sendo inicialmente descrita como inibidora da osteoclastogênese. Este efeito está associado com a supressão da diferenciação e ativação de osteoclastos, inibindo a produção de RANKL e aumentando a de OPG (DRESNER-POLLAK et al., 2004; LEE et al., 2008; LORENZO; HOROWITZ; CHOI, 2008). Além deste efeito direto, por ser uma potente citocina anti-inflamatória, IL-10 pode modular a homeostase óssea indiretamente, uma vez que suprimindo a resposta inflamatória, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , caracteristicamente osteoclastogênicas (AL-RASHEED et al., 2004; DRESNER-POLLAK et al., 2004; LONG et al., 2001; MONJO et al., 2008). Por fim, estudos demonstraram que a ausência de IL-10 acelera a perda óssea periodontal (AL-RASHEED et al., 2003; AL-RASHEED et al., 2004) e leva a uma diminuição na densidade óssea (osteopenia), uma menor formação óssea, além de aumentar o mecanismo de fragilidade, tornando mais susceptível à osteoporose (DRESNER-POLLAK et al., 2004). Resultados de nosso laboratório (CLAUDINO et al., 2010) demonstram que a ausência de IL-10 leva a uma perda óssea alveolar espontânea (sem a indução deliberada de doença periodontal ou colocação de ligaduras) em camundongos, e que esta perda óssea se mostra associada à diminuição na expressão de marcadores de formação óssea como fosfatase alcalina e osteocalcina, reforçando o importante papel das citocinas na homeostasia óssea, mesmo em condições fisiológicas.

Estudos ainda demonstram a expressão aumentada de IL-10 entre 1 e 10 dias após a lesão muscular em camundongos iNOS $^{+/+}$ e iNOS $^{-/-}$, porém os níveis de mRNA de IL-10 foram significativamente superiores nos músculos lesionados de camundongos iNOSKO (RIGAMONTI et al., 2013). Nossos resultados, porém, não demonstraram diferença significativa nos níveis de expressão de IL-10 entre os animais WT-A e iNOSKO-A. Também em modelo experimental de doença periodontal, quantidades moderadas de IL-12 e valores mais baixos de IL-10 foram detectados nos camundongos iNOSKO infectados por *P. gingivalis*, enquanto ambas as citocinas eram ausentes nos animais iNOS $^{+/+}$ infectados por *P. gingivalis* (ALAYAN et al., 2006).

Por fim, outro aspecto importante da iNOS que interfere, indiretamente, na

migração de células inflamatórias no local da infecção, refere-se ao seu poder microbicida. Estudos demonstram que iNOS tem capacidade de eliminar diversos periodontopatógenos *in vitro* (ALLAKER et al., 2001; GYURKO et al., 2003; MIYASAKI; BODEAU; FLEMMIG, 1991; MIYASAKI; WILSON; GENCO, 1986). Também *in vivo*, em modelo de doença periodontal, foi observado que camundongos iNOSKO apresentavam um aumento significativo na carga bacteriana nos tecidos periodontais e também níveis de CRP no soro significativamente maior que nos camundongos WT (GARLET, 2005). Já, em modelo de lesões periapicais em gatos, animais que foram tratados com aminoguanidina, um inibidor seletivo da iNOS, apresentaram grau de inflamação periapical significativamente menor do que aqueles que não foram tratados (FARHAD et al., 2011). Por fim, a ausência da enzima pleiotrópica óxido nítrico sintase induzível (iNOS) resulta em lesões periapicais maiores com o recrutamento de um maior número de células inflamatórias e frequentemente associada com o desenvolvimento de abscessos periapicais (FUKADA et al., 2008).

Assim sendo, observamos pelos nossos resultados, que animais iNOSKO em condições infecciosas apresentaram uma resposta antimicrobiana deficiente devido à ausência de produção de NO pela iNOS e, conseqüentemente apresentaram menor número de células inflamatórias a partir do período de 7 dias pós-exodontia.

Outra variação pontual observada na ausência de iNOS refere-se aos vasos sanguíneos, os quais foram significativamente mais numerosos nos animais iNOSKO-C, no período de 14 dias, quando comparados aos animais WT-C (Figura 9). Em condições infecciosas, foi observada uma tendência à maior quantidade de vasos sanguíneos também pelos animais iNOSKO-A, porém sem diferença estatisticamente significativa. Se contrapondo aos nossos resultados, estudos demonstram que o aumento das concentrações de NO encontradas em muitos cânceres humanos pode facilitar a angiogênese e a disseminação do tumor (BRENNAN et al., 2003). Além disso, é bem estabelecido o papel vasodilatador do radical NO durante uma determinada injúria; assim, extensivas evidências demonstram que, em altas doses, o NO apresenta um papel patofisiológico, inibindo mecanismos básicos de homeostasia (DIAS-JUNIOR; CAU; TANUS-SANTOS, 2008). Porém, em nosso modelo experimental, mesmo em elevadas doses (WT-A) o NO não alterou de maneira significativa a densidade de volume dos vasos sanguíneos.

Apesar da ausência de iNOS interferir, de maneira discreta, na densidade do coágulo sanguíneo, infiltrado inflamatório e tecido conjuntivo em nosso modelo experimental, há relatos de que o NO apresenta um papel direto na formação do tecido ósseo (BRANDI et al., 1995; DAMOULIS; HAUSCHKA, 1994; LOWIK et al., 1994; MACINTYRE et al., 1991; MANCINI et al., 2000; NUSSLER et al., 1992; RALSTON et al., 1994; RIANCHO et al., 2009; VAN'T HOF; RALSTON, 2001). Além disso, estudos demonstram que a reabsorção óssea induzida por IL-1 é praticamente ausente em camundongos iNOSKO, devido a uma falha em manter a ativação do NF- κ B em osteoclastos (VAN'T HOF et al., 2000). Da mesma forma, a perda óssea induzida por ovariectomia é muito reduzida na ausência de um gene funcional iNOS (CUZZOCREA et al., 2003), e a osteoporose induzida pela inflamação é significativamente atenuada em camundongos iNOSKO (ARMOUR et al., 2001). Apesar dessas evidências, nossos resultados não demonstraram diferença significativa na quantidade de matriz óssea entre os animais WT e iNOSKO durante o processo de reparo ósseo alveolar. Entretanto, alterações na densidade de volume de células ósseas foram observadas entre os diferentes grupos analisados. Em condições homeostáticas, por exemplo, camundongos iNOSKO-C apresentaram uma tendência à maior quantidade de osteoblastos no período de 7 dias pós-exodontia quando comparados aos animais WT-C. Já na alveolite, as diferenças na densidade de volume de osteoblastos e osteoclastos foram estatisticamente significativas, sugerindo que, em elevadas doses, iNOS apresenta importante papel no processo de reparo ósseo alveolar, atuando diretamente sobre as células ósseas.

Estudos demonstram que o óxido nítrico é um importante mediador citotóxico no microambiente ósseo e, juntamente com citocinas e fatores de crescimento, pode ser responsável pela deficiente formação óssea observada em sítios inflamatórios crônicos, visto que em concentrações elevadas, o NO apresenta um efeito citotóxico significativo sobre as células da linhagem osteoblástica (DAMOULIS; HAUSCHKA, 1997). Entre as células ósseas especializadas, os osteoblastos são a principal fonte de iNOS, embora a indução de iNOS já tenha sido descrita em osteoclastos (BRANDI et al., 1995; FOX; CHOW, 1998). Enquanto as células ósseas adultas não expressam iNOS sem indução, observa-se a expressão regulada de iNOS em osteoblastos e osteoclastos de ratos neonatais, que cessam gradualmente após 4 semanas do parto (HUKKANEN et al., 1999). No osso adulto, os efeitos da indução

da iNOS parece ser complexo. Tem sido demonstrado que NO, em baixos níveis, promove o crescimento e diferenciação dos osteoblastos tanto na forma autócrina (RIANCHO et al., 2009) quanto na forma parácrina (BRANDI et al., 1995; BUTTERY et al., 1999). Por outro lado, altos níveis de NO inibem o crescimento e a diferenciação tanto osteoblástica quanto osteoclástica (BRANDI et al., 1995; MACINTYRE et al., 1991; RALSTON et al., 2009; RALSTON et al., 1994; VAN'T HOF; RALSTON, 1997). Sendo assim, os efeitos do NO sobre o metabolismo ósseo permanecem ambíguos com estudos relatando tanto efeitos estimulatórios quanto inibitórios, dependendo dos níveis de NO e do modelo utilizado (CHAE et al., 1997; RALSTON et al., 2009).

De acordo com esses achados na literatura, observamos que em condições homeostáticas, não houve diferença significativa na densidade de volume de osteoblastos entre os grupos WT-C e iNOSKO-C. Porém, quando submetidos à alveolite experimental, os animais iNOSKO-A apresentaram maior quantidade de osteoblastos no período de 7 dias pós-exodontia e uma tendência à maior concentração dessas células nos demais períodos do reparo ósseo, quando comparados aos animais WT-A (Figura 10). Esse resultado reforça o efeito inibitório do crescimento e da diferenciação osteoblástica do NO, quando presente em elevadas doses (BRANDI et al., 1995; MACINTYRE et al., 1991; RALSTON et al., 2009; RALSTON et al., 1994; VAN'T HOF; RALSTON, 1997).

Os resultados moleculares comprovaram as alterações histomorfométricas observadas em relação aos osteoblastos. Em condições homeostáticas, observou-se expressão significativamente maior de RUNX2, importante marcador de osteoblastos, nos animais iNOSKO-C quando comparados aos animais WT-C, no período de 7 dias pós-exodontia. Em relação aos demais marcadores do metabolismo ósseo (BMP2, COL1A1, ALP, OCN, DMP1 e PHEX) não observamos diferenças significativas na cinética de expressão desses genes nos animais iNOSKO e WT, nas mesmas condições (Figura 13).

Por fim, observou-se diferença significativa na quantidade de osteoclastos entre os animais WT-A e iNOSKO-A. Os animais iNOSKO-A apresentaram quantidade significativamente maior de osteoclastos, no período de 21 dias pós-exodontia, quando comparados aos animais WT-A. Dessa forma, fica claro que o NO apresenta uma função potencialmente importante no metabolismo ósseo, de acordo com sua concentração, modulando a atividade blástica e clástica (BLIX;

HELGELAND, 1998; SHAPIRA; FROLOV; BEN-NATHAN, 2000; TAYLOR-ROBINSON et al., 1994). Além disso, o NO interfere no processo de reabsorção óssea de maneira indireta, uma vez que ele está associado à produção de TNF- α , que por sua vez, interfere diretamente nesse processo.

Analisando a expressão dos marcadores de osteoclastos, observamos que, na ausência de infecção, a diferença de expressão de CTSK e OPG é mínima entre os grupos WT-C e iNOSKO-C. Porém, observamos expressão de RANKL significativamente maior nos animais WT-C, nos períodos de 7 e 14 dias pós-exodontia, quando comparados aos animais iNOSKO-C. Em condições infecciosas, no entanto, observamos maiores níveis de expressão dos marcadores de osteoclastos de uma maneira geral, havendo diferença significativa entre os grupos WT-A e iNOSKO-A nos níveis de expressão de RANKL e CTSK.

Estudos demonstram que o NO tem efeitos inibidores sobre a expressão de RANKL (FAN et al., 2006). A carga esquelética promove a inibição da reabsorção óssea pela supressão da RANKL, enquanto ao mesmo tempo gera NO (RUBIN; RUBIN; JACOBS, 2006), de modo que, a supressão de RANKL é dependente da produção de NO (RAHNERT et al., 2008). É importante notar que o NO tem um potente efeito inibidor sobre a diferenciação dos osteoclastos por diminuir a sinalização de RANKL (FAN et al., 2004), atuando assim, como um sinal de feedback negativo para limitar a osteoclastogênese (ZHENG et al., 2006).

De acordo com nossos resultados, camundongos geneticamente modificados para não apresentar iNOS (iNOSKO) em um modelo experimental de lesão periapical, apresentaram um aumento significativo na expressão de RANK, juntamente à uma redução na expressão de OPG, quando comparados aos camundongos WT, demonstrando a participação de tal enzima na atividade osteoclástica, em modelos infecciosos (FUKADA et al., 2008).

Ainda em relação aos osteoclastos, estudos sugerem que a estimulação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) promove a sobrevivência dos osteoclastos diferenciados, e a geração de NO dependente da iNOS contribui para a função de sobrevivência e promoção de osteoclastos pelo TNF- α (LEE et al., 2004). Além disso, estudos demonstram que o NO endógeno pode estimular osteoclastos, e *in vivo* indicam que o NO é necessário para adequada função dos osteoclastos e osteoblastos (CUZZOCREA et al., 2003). Por outro lado, alguns investigadores têm mostrado que a administração por via exógena de altas concentrações de NO pode

induzir a apoptose em osteoclastos e osteoblastos (ARMOUR et al., 2001), assim como o NO endógeno, derivado da citocina óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que também induz apoptose de progenitores de osteoclastos e osteoblastos (ARMOUR et al., 2001; VAN'T HOF; RALSTON, 1997). De fato, nosso estudo demonstrou um aumento na densidade de volume de osteoblastos e osteoclastos nos animais iNOSKO submetidos à alveolite experimental, quando comparados aos animais WT-A. Além disso, como houve um aumento proporcional de osteoblastos e osteoclastos nesses animais, essas alterações, tomadas em conjunto, não alteraram a densidade de volume da matriz óssea nesses animais, que foi bastante semelhante aos animais WT em condições infecciosas.

Em termos de efeitos diretos do NO nos osteoclastos *in vitro*, dados publicados previamente são contraditórios, tornando difícil a proposta de um mecanismo único, sem considerar os detalhes experimentais. Por exemplo, o nitroprussiato de sódio doador de NO (SNP) em baixas concentrações reduz a formação e atividade de osteoclastos em cultura de medula óssea murina (HOLLIDAY et al., 1997). Por outro lado, em co-culturas de osteoblastos e osteoclastos, altos níveis de NO produzido por osteoblastos podem inibir a reabsorção óssea por dois mecanismos: indução de apoptose de células progenitoras de osteoclastos presentes nas populações de células da medula óssea, e inibição da atividade de reabsorção óssea pelos osteoclastos maduros (VAN'T HOF; RALSTON, 1997). Em um modelo de perda óssea secundária à exposição pulpar seguida de inoculação bacteriana, camundongos iNOSKO desenvolveram maior recrutamento de células inflamatórias, lesões osteolíticas e mais osteoclastos TRAP-positivos do que os camundongos WT (FUKADA et al., 2008).

Com base nesses resultados, podemos sugerir que os efeitos do NO sobre o metabolismo ósseo são altamente dependentes dos montantes disponíveis para este mediador: considerando que em pequenas quantidades, NO pode apoiar a formação osteoblástica do osso e a remodelação óssea mediada por osteoclastos (BRANDI et al., 1995; CHOLE et al., 1998; JAMAL et al., 1998; RALSTON et al., 2009; VAN'T HOF et al., 2000); enquanto a biossíntese aumentada de NO (ou a administração de compostos doadores de NO) pode inibir, de forma concentração-dependente, a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea. Alguns estudos mostram que o derivado da iNOS medeia a perda óssea direta ou indiretamente, modulando a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 (IL-

1) (VAN'T HOF et al., 2000). Além disso, a inibição farmacológica de NO pela aminoguanidina ou mercaptoetilguanidina resulta na diminuição da perda óssea, indicando o NO como um alvo farmacêutico no manejo das doenças periodontais (LOHINAI et al., 1998) (DAGHIGH et al., 2002; DI PAOLA et al., 2004). Contraditoriamente, outros estudos demonstram que a deficiência de iNOS pode acelerar a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea *in vivo* e *in vitro*, diminuindo a massa óssea normal, agravando a destruição do osso em modelos de artrite ou osteoporose, e interferindo com o reparo ósseo (DIWAN et al., 2010; MCCARTNEY-FRANCIS et al., 2001; TSUKAHARA et al., 1996; VEIHELMANN et al., 2001; WIMALAWANSA, 2000).

Em relação às demais estruturas alveolares analisadas nesse estudo, não foram observadas diferenças relevantes entre os grupos, de modo que, descreveremos resumidamente alguns desses resultados.

Estudos de reparo ósseo alveolar em camundongos descrevem que o processo de reparo inicia-se com a formação de coágulo sanguíneo no interior do alvéolo, seguido pela presença de uma rede de fibrina que recobre a superfície do coágulo (COLAVITE, 2009). De fato, os dados obtidos no presente estudo mostraram uma intensa quantidade de coágulo sanguíneo na fase inicial do reparo alveolar, tanto nos camundongos WT quanto nos camundongos geneticamente modificados para não expressarem iNOS.

É bem estabelecido o papel vasodilatador do radical NO durante uma determinada injúria; assim, extensivas evidências demonstram que, em altas doses, o NO apresenta um papel patofisiológico, inibindo mecanismos básicos de homeostasia (DIAS-JUNIOR; CAU; TANUS-SANTOS, 2008). Porém, em um processo normal de reparo, como é o caso do reparo ósseo alveolar, os níveis de NO apresentam-se relativamente baixos quando comparados aos de uma infecção ou presença de epítomos microbianos (REPEKE et al., 2010). De fato, a ausência de iNOS no reparo alveolar experimental parece não influenciar de maneira fundamental na cinética da densidade de coágulo, na ausência de infecção. O mesmo foi observado em relação aos animais submetidos à alveolite experimental, uma vez que não houve diferença significativa na densidade de volume do coágulo sanguíneo entre os grupos WT-A e iNOSKO-A.

Ao analisarmos a diferença na densidade de volume de fibras e fibroblastos entre os camundongos WT e iNOSKO, não foram observadas diferenças

significativas entre os grupos, os quais apresentaram uma cinética muito semelhante, tanto em condições homeostáticas quanto infecciosas. Porém, em modelo experimental de doença periodontal, camundongos *knockout* para iNOS apresentaram danos mais extensos nos tecidos moles e maior perda de osso alveolar em resposta à infecção por *P. gingivalis* em comparação aos camundongos do tipo selvagem (ALAYAN et al., 2006). Além disso, o NO derivado da iNOS pode estimular a migração apical do epitélio juncional e a destruição das fibras de colágeno mediada pelas metaloproteinases de matriz (MMP) (MACLEAN et al., 1998; MONCADA; HIGGS, 2008). Curiosamente, além de aumentar a atividade de MMP-1 nos osteoblastos presentes em regiões de reabsorção óssea (MACLEAN et al., 1998) e ativar neutrófilos pró-colagenase (MMP-8), através de intermediários reativos derivados do ânion peroxinitrito e dióxido de nitrogênio (RALSTON et al., 2009), o NO também pode diminuir a síntese de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (BIRD et al., 1995), aumentando assim a degradação do tecido conjuntivo.

De fato, analisando a expressão do colágeno tipo 1 (COL1A1), um dos principais constituintes do tecido conjuntivo, observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos quando submetidos às mesmas condições. Porém, quando comparamos os níveis de expressão desse gene em condições não infecciosas e após a indução da alveolite experimental, fica claro que em condições infecciosas há uma redução significativa nos níveis de expressão de COL1A1, um dos motivos que poderia justificar o atraso no reparo ósseo alveolar observado nos casos de alveolite (RODRIGUES et al., 2011).

Frente aos resultados discutidos anteriormente e à cinética de expressão de iNOS durante o processo de reparo ósseo alveolar, vale ressaltar que, na alveolite, esperávamos maiores variações no processo de reparo ósseo alveolar, devido à expressão relativamente elevada de iNOS, e, como vimos, seus efeitos dose-dependente. Porém, mesmo na alveolite experimental, vimos que as alterações durante o reparo ósseo alveolar foram pontuais e discretas. Quais poderiam ser as razões para tais resultados?

Nossa primeira justificativa para essas alterações serem discretas, mesmo na presença do processo infeccioso, diz respeito ao nosso modelo experimental. Modelos experimentais de alveolite induzida em ratos apresentaram características de alveolite supurativa aguda semelhante a modelos humanos, incluindo a formação

de pus no fundo do alvéolo, edema gengival, envolvimento de bactérias semelhantes, envolvimento sistêmico e atraso no processo de reparo ósseo alveolar (RODRIGUES, 2011). Também nesses modelos, a análise histométrica demonstrou uma formação óssea uniforme nos animais não infectados, havendo uma correlação entre o aumento da densidade do tecido ósseo e redução de coágulo sanguíneo, redução significativa da densidade do tecido conjuntivo e redução da densidade de infiltrado inflamatório em diferentes períodos experimentais. Os grupos infectados (com alveolite experimental induzida) apresentaram atraso na formação do tecido ósseo. Houve correlação positiva entre a densidade óssea e aumento do tecido conjuntivo correlacionada com infiltrado inflamatório e redução da densidade de coágulo sanguíneo, mostrando que o processo de reparo alveolar foi mais lento no grupo de animais infectados (RODRIGUES et al., 2011). Além disso, o grupo dos animais não infectados mostrou maior densidade de osso em todos os períodos analisados, em relação ao grupo dos animais infectados, confirmando o reparo ósseo alveolar perturbado decorrente da infecção alveolar (RODRIGUES et al., 2011).

Em nosso modelo experimental, contudo, a presença da alveolite experimental não demonstrou tais alterações clínicas e não alterou, de maneira significativa, a cinética do reparo ósseo alveolar. Houve, portanto, elevada densidade de volume de coágulo sanguíneo no período inicial do reparo, tanto nos animais WT-A quanto iNOSKO-A. Tal discrepância em nossos resultados pode estar diretamente associada ao nosso modelo experimental, uma vez que o metabolismo murino é mais acelerado que o metabolismo dos demais animais utilizados em experimentos (BODNER et al., 1993; KORPI et al., 2009; WITTE; BARBUL, 1997). Assim sendo, a indução da alveolite experimental em nossos camundongos provavelmente tenha se estabelecido de uma maneira pouco severa e transitória, o que pode estar associado à resposta imunológica acelerada desses animais frente à infecção. Assim, no modelo experimental utilizado nesse estudo, a lesão tecidual decorrente do trauma cirúrgico se mostra como um estímulo inflamatório menos agressivo quando comparado aos modelos com inoculação de bactérias (GARLET; CARDOSO; CAMPANELLI et al., 2007). Porém, mesmo frente à indução da alveolite experimental, nossos animais não apresentaram alterações significativas na cinética de reparo ósseo alveolar. Provavelmente, os camundongos não atingiram um nível tal de inflamação capaz de elevar suficientemente a quantidade de iNOS, no

presente modelo, para alterar, de maneira significativa, a cinética do processo de reparo ósseo alveolar.

Além disso, mesmo observando um aumento expressivo na cinética de expressão de iNOS durante o reparo ósseo nos animais WT-A, vimos que esse aumento permaneceu transitório e não crônico, apresentando rápido declínio a partir do período de 7 dias pós-exodontia. Sendo assim, as variações durante o processo de reparo permaneceram discretas e pontuais, quando comparamos os grupos WT-A e iNOSKO-A.

Por fim, muitos trabalhos *in vitro* descrevem o papel da iNOS atuando diretamente sobre células ósseas, porém *in vivo*, como é o caso do nosso modelo experimental, outras moléculas estão envolvidas no processo de reparo ósseo, podendo compensar a ausência dessa enzima e, assim, não promover maiores alterações durante o processo de reparo ósseo alveolar.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados da análise microscópica e molecular do processo de reparo ósseo alveolar, podemos concluir que:

- 1- A expressão de iNOS esteve presente durante todo o processo de reparo ósseo alveolar nos camundongos C57Bl/6, porém de maneira mais expressiva no período de 7 dias pós-exodontia;
- 2- A expressão de iNOS aumenta consideravelmente frente ao estímulo infeccioso, entretanto sua cinética de expressão é semelhante à condição homeostática;
- 3- Em condições homeostáticas, a ausência de iNOS não impactou de forma significativa o processo de reparo ósseo alveolar pós-exodontia, mas mostrou-se associada à modulação de vasos sanguíneos;
- 4- Em condições infecciosas, a ausência de iNOS não impactou de forma significativa o processo de reparo ósseo alveolar pós-exodontia, mas mostrou-se associada à modulação de células inflamatórias, osteoblastos e osteoclastos;
- 5- Considerando que a influência de iNOS na modulação de vasos sanguíneos, células inflamatórias, osteoblastos e osteoclastos se mostrou diferente em condições homeostáticas e infecciosas, conclui-se que a influência de iNOS, ainda que pontual, pode ser dose-dependente.

Referências

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Aggarwal R, Ghobrial IM, Roodman GD. Chemokines in multiple myeloma. *experimental hematology*. 2006 34(10):1289-95.

Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res*. 2008 87(2):107-18.

Alayan J, Ivanovski S, Gemmell E, Ford P, Hamlet S, Farah C. Deficiency of iNOS contributes to *Porphyromonas Gingivalis*-Induced tissue damage. *Oral Microbiol Immunol*. 2006 21(6):360-5.

Albani D, Mazzuco S, Polito L, Batelli S, Biella G, Ongaro F, et al. Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor polymorphism Rs2229765 and circulating Interleukin-6 level affect male longevity in a population-based prospective study (treviso longa--tre-long). *Aging Male*. 2011 14(4):257-64.

Allaker RP, Silva Mendez LS, Hardie JM, Benjamin N. Antimicrobial effect of acidified nitrite on periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 2001 16(4):253-6.

Al-Rasheed A, Scheerens H, Rennick DM, Fletcher HM, Tatakis DN. Accelerated alveolar bone loss in mice lacking Interleukin-10. *J Dent Res*. 2003 82(8):632-5.

Al-Rasheed A, Scheerens H, Srivastava AK, Rennick DM, Tatakis DN. Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10: late onset. *J Periodontal Res*. 2004 39(3):194-8.

Arany I, Brysk MM, Brysk H, Tying SK. Regulation of inducible nitric oxide synthase mrna levels by differentiation and cytokines in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 220(3):618-22.

Armour KE, Van't Hof RJ, Grabowski PS, Reid DM, Ralston SH. Evidence for a pathogenic role of Nitric Oxide in inflammation-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 1999 14(12):2137-42.

Armour KJ, Armour KE, Van't Hof RJ, Reid DM, Wei XQ, Liew FY, et al. Activation of the Inducible Nitric Oxide Synthase pathway contributes to inflammation-induced

osteoporosis by suppressing bone formation and causing osteoblast apoptosis. *Arthritis Rheum.* 2001 44(12):2790-6.

Barnes P, Lu S, Abrams J, Wang E, Yamamura M, Modlin R. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect Immun.* 1993 61(8):3482-9.

Baumgartner JC, Xia T. Identification of spirochetes (Treponemes) in endodontic infections. *J Endod.* 2003 29(12):794-7.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1990 87(4):1620-4.

Behl Y, Siqueira M, Ortiz J, Li J, Desta T, Faibish D, et al. Activation of the acquired immune response reduces coupled bone formation in response to a periodontal pathogen. *J Immunol.* 2008 15;181(12):8711-8.

Bidri M, Ktorza S, Vouldoukis I, Le Goff L, Debré P, Guillosson JJ, et al. Nitric oxide pathway is induced by f ϵ ri and up-regulated by stem cell factor in mouse mast cells. *Eur J Immunol.* 1997 27(11):2907-13.

Biniecka M, Kennedy A, Ng CT, Chang TC, Balogh E, Fox E, et al. Successful tumour necrosis factor (tnf) blocking therapy suppresses oxidative stress and hypoxia-induced mitochondrial mutagenesis in inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2011 13(4):R121.

Bird PS, Gemmell E, Polak B, Paton RG, Sosroseno W, Seymour GJ. Protective immunity to porphyromonas gingivalis infection in a murine model*. *J Periodontol.* 1995 66(5):351-62.

Birn H. Bacteria and Fibrinolytic Activity in "Dry Socket". *Odontol acta.* 1970 28(6):773-83.

Birn H. Etiology and pathogenesis of fibrinolytic alveolitis. *Int J Oral Surg.* 1973a 2(5):211-63.

Birn H. Fibrinolytic activity of alveolar bone in dry socket. *Odontol acta.* 1972a 30(1):23-32.

Birn H. Kinines and pain in "dry socket". *Int J Oral Surg.* 1972b 1(1):34-42.

- Birn H. Ways of spreading dental infections. *Med Hyg.* 1973b 31(73):1469.
- Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by Nitric Oxide. *Am J Pathol.* 1995 146(1):75.
- Blix IJ, Helgeland K. Lps from *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* and production of Nitric Oxide in murine macrophages J774. *Eur J Oral Sci.* 1998 106(1):576-81.
- Blum IR. Contemporary views on dry socket (alveolar osteitis): a clinical appraisal of standardization, aetiopathogenesis and management: a critical review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002 31(3):309-17.
- Bocca AL, Hayashi EE, Pinheiro AG, Furlanetto AB, Campanelli AP, Cunha FQ, et al. Treatment of paracoccidioides brasiliensis-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J Immunol* 1998 161(6):3056.
- Bodner L, Kaffe I, Littner MM, Cohen J. Extraction site healing in rats: a radiologic densitometric study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993 75(3):367-72.
- Bogdan C, Vodovotz Y, Paik J, Xie QW, Nathan C. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J Leukoc Biol.* 1994 55(2):227-33.
- Boonrungsiman S, Gentleman E, Carzaniga R, Evans ND, McComb DW, Porter AE, et al. The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation. *Proc Natl Acad Sci.* 2012 109(35):14170–5
- Boyce BF, Xing L. Functions of rankl/rank/opg in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008 473(2):139-46.
- Brandi M, Hukkanen M, Umeda T, Moradi-Bidhendi N, Bianchi S, Gross S, et al. Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. *Proc Natl Acad Sci.* 1995 92(7):2954-8.
- Brennan P, Sharma S, Bowden J, Umar T. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in bone metastases. *Eur J Surg Oncol (EJSO).* 2003 29(7):619-23.
- Bronckers A, Engelse M, Cavender A, Gaikwad J, D'Souza R. Cell-Specific patterns of cbfa1 mrna and protein expression in postnatal murine dental tissues. *Mech Dev.* 2001 101(1):255-8.

- Brown JP, Josse RG. 2002 Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *CMAJ*. 2002 12;167(10 Suppl):S1-34.
- Brown LR, Merrill SS, Allen RE. Microbiologic study of intraoral wounds. *J Oral Surg*. 1970 28(2):89-95.
- Buttery L, Aguirre I, Hukkanen M, Mancini L, Moradi-Bidhendi N, Huang P, et al. Nitric Oxide stimulates osteoblast replication and development. *J Bone Mineral Res*. 1999 14(11):54-8.
- Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 2003 8(21):980-9.
- Cardoso CL, Rodrigues MTV, Júnior OF, Garlet GP, De Carvalho PSP. Clinical concepts of dry socket. *J Maxillofac Oral Surg*. 2010 68(8):1922-32.
- Cardoso CL. Análise morfométrica e molecular da alveolite induzida em ratos com diferentes modalidades de tratamento. [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2009.
- Carvalho ACP, Okamoto T. Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados à clínica; *Oral Surgery: Experimental Basis to Clinical Application*. 1987.
- Catellani JE. Review of factors contributing to dry socket through enhanced fibrinolysis. *J Oral Surg*. 1979 37(1):42-6.
- Cerri PS. Osteoblasts engulf apoptotic bodies during alveolar bone formation in the rat maxilla. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2005 286(1):833-40.
- Chae H, Park R, Chung H, Kang JS, Kim M, Choi D, et al. Nitric Oxide is a regulator of bone remodelling. *J Pharm Pharmacol*. 1997 49(9):897-902.
- Chan GK, Duque G. Age-Related bone loss: old bone, new facts. *Gerontology*. 2002 48(2):62-71.
- Chenu C, Colucci S, Grano M, Zigrino P, Barattolo R, Zambonin G, et al. Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *J Cell Biol*. 1994 127(4):1149-58.

Chole RA, Tinling SP, Leverenz E, McGinn MD. Inhibition of Nitric Oxide Synthase blocks osteoclastic bone resorption in adaptive bone modeling. *Acta Otolaryngol.* 1998 118(5):705-11.

Claudino M, Garlet TP, Cardoso CR, de Assis GF, Taga R, Cunha FQ, et al. Down-Regulation of expression of osteoblast and osteocyte markers in periodontal tissues associated with the spontaneous alveolar bone loss of interleukin-10 knockout mice. *Eur J Oral Sci.* 2010 118(1):19-28.

Colavite PM. Participação do TNF-alfa no processo de reparo ósseo alveolar após exodontia em camundongos. [dissertação]. Bauru (SP): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2009.

Colopy S, Benz-Dean J, Barrett J, Sample S, Lu Y, Danova N, et al. Response of the osteocyte syncytium adjacent to and distant from linear microcracks during adaptation to cyclic fatigue loading. *Bone.* 2004 35(4):881-91.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Collins T. *Patologia estrutural e funcional.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996.

Cowin SC, editor. *Bone mechanics handbook.* 2nd Ed. Boca Raton: CRC Press; 2001.

Cox GW, Melillo G, Chattopadhyay U, Mullet D, Fertel RH, Varesio L. Tumor Necrosis Factor-Alpha-Dependent production of reactive nitrogen intermediates mediates ifn-gamma plus IL-2-induced murine macrophage tumoricidal activity. *J Immunol.* 1992 149(10):3290-6.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Genovese T, Di Paola R, Ruggeri Z, et al. Inducible Nitric Oxide Synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. *Endocrinology.* 2003 144(3):1098-107.

Daghigh F, Borghaei RC, Thornton RD, Bee JH. Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. *J Periodontol.* 2002 73(4):392-400.

Damoulis PD, Hauschka PV. Cytokines induce nitric oxide production in mouse osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 201(2):924-31

Damoulis PD, Hauschka PV. Nitric Oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 1997 12(3):412-22.

D'Antonio GM. Contaminação pós-exodôntica do alvéolo dental de ratos: estudo microbiológico e histológico [dissertação] Araçatuba (SP): Faculdade de Odontologia de Aracatuba, UNESP; 1984.

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

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

de Carvalho P, Okamoto T, de Carvalho A. The Influence of intra-alveolar curettage on wound healing after tooth extraction. a histological study in rats. *J Nihon Univ Sch Dent*. 1982 24(1):28.

de Melo Junior EJ, Raposo MJ, Lisboa Neto JA, Diniz MF, Marcelino Junior CA, Sant'Ana AE. Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: microbiological and microscopic analysis. *Phytomedicine*. 2002 9(2):109-16.

de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Garlet GP, de Souza RF, Taba M, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *J Periodontol*. 2009 80(1):98-105.

Di Paola R, Marzocco S, Mazzon E, Dattola F, Rotondo F, Britti D, et al. Effect of Aminoguanidine in ligature-induced periodontitis in rats. *J Dent Res*. 2004 83(4):343-8.

Dias-Junior CA, Cau SBA, Tanus-Santos JE. Role of Nitric Oxide in the control of the pulmonary circulation: physiological, pathophysiological, and therapeutic implications. *J Bras Pneumol*. 2008 34(6):412-9.

Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 2005 36(12):1392-404.

Dinarello CA. Proinflammatory cytokines*. *Chest*. 2000 118(2):503-8.

Diwan AD, Wang MX, Jang D, Zhu W, Murrell GAC. Nitric Oxide modulates fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2010 15(2):342-51.

Dresner-Pollak R, Gelb N, Rachmilewitz D, Karmeli F, Weinreb M. Interleukin 10-deficient mice develop osteopenia, decreased bone formation, and mechanical fragility of long bones. *Gastroenterology*. 2004 127(3):792-801.

- Duong LT, Rodan GA. Regulation of osteoclast formation and function*. Rev Endocr Metab Disord 2001 2(1):95-104.
- Elsubeihi ES, Heersche JNM. Quantitative Assessment of post-extraction healing and alveolar ridge remodelling of the mandible in female rats. Arch Oral Biol. 2004 49(5):401-12.
- Evans DM, Ralston SH. Nitric Oxide and Bone. J Bone Miner Res. 1996 11(3):300-5.
- Fan X, Rahnert JA, Murphy TC, Nanes MS, Greenfield EM, Rubin J. Response to mechanical strain in an immortalized pre-osteoblast cell is dependent on Erk1/2. J Cell Physiol. 2006 207(2):454-60.
- Fan X, Roy EM, Murphy TC, Nanes MS, Kim S, Pike J, et al. Regulation of RANKL promoter activity is associated with histone remodeling in murine bone stromal cells. J Cell Biochem. 2004 93(4):807-18.
- Farhad AR, Razavi S, Jahadi S, Saatchi M. Use of Aminoguanidine, a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor, to evaluate the role of Nitric Oxide in periapical inflammation. J Oral Sci. 2011 53(2):225-30.
- Feelisch M, Stamler JS. Methods in Nitric Oxide research. New York: John Wiley & Sons Inc; 1996.
- Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor and the regulation of angiogenesis. Recent Prog Horm Res. 2000 55:15-35.
- Fierro IM, Nascimento-DaSilva V, Arruda M, Freitas MS, Plotkowski MC, Cunha FQ, et al. Induction of NOS in rat blood pmn in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity. J Leukoc Biol. 1999 65(4):508-14.
- Fox S, Chow J. Nitric Oxide Synthase expression in bone cells. Bone. 1998 23(1):1-6.
- framework for signal traffic in adult human bone. J Cell Biochem 1994;55:273–86.
- Frolov I, Hourí-Hadad Y, Soskolne A, Shapira L. In Vivo exposure to porphyromonas gingivalis up-regulates nitric oxide but suppresses tumour necrosis factor- α production by cultured macrophages. Immunology. 1998 93(3):323-8.

Frost HM. Dynamics of bone remodeling. In: Frost HM, editor. Bone Biodynamics. Boston: Little, Brown & Co; 1964.

Frost HM. The skeletal intermediary organization. *Metab Bone Dis Rel Res* 1983;4: 281–90.

Fukada SY, Silva TA, Saconato IF, Garlet GP, Avila-Campos MJ, Silva JS, et al. Inos-Derived Nitric Oxide modulates infection-stimulated bone loss. *J Dent Res*. 2008 87(12):1155-9.

Galson DL, Roodman GD. Origins of Osteoclasts. In: *Osteoimmunology: interactions of the immune and skeletal systems*. 1 ed. Londres: Elsevier; 2011. p.7-43

Gansauge S, Gansauge F, Nussler AK, Rau B, Poch B, Schoenberg MH, et al. Exogenous, but not endogenous, nitric oxide increases proliferation rates in senescent human fibroblasts. *FEBS Lett*. 1997 410(2-3):160-4.

Garlet G, Cardoso C, Campanelli A, Ferreira B, Avila-Campos M, Cunha F, et al. The dual role of p55 tumour necrosis factor- α receptor in actinobacillus actinomycetemcomitans-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol*. 2007 147(1):128-38.

Garlet G, Cardoso C, Silva T, Ferreira B, Ávila-Campos M, Cunha F, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by actinobacillus actinomycetemcomitans through the modulation of mmps, rankl, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol*. 2006 21(1):12-20.

Garlet GP, Avila-Campos MJ, Milanezi CM, Ferreira BR, Silva JS. Actinobacillus Actinomycetemcomitans-Induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. *Microbes Infect. / Institut Pasteur*. 2005 7(4):738-47.

Garlet GP, Cardoso CRB, Campanelli AP, Garlet TP, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. The essential role of ifn- γ in the control of lethal *aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *Microbes Infect*. 2008 10(5):489-96.

Garlet GP. Participação de citocinas na imunomodulação da doença periodontal experimental induzida por actinobacillus actinomycetemcomitans. [dissertação]. Ribeirão Preto (SP):Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2005.

Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against trypanosoma cruzi involves an l-arginine-

dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *Eur J Immunol*. 1992 22(10):2501-6.

Genco CA, Van Dyke T, Amar S. Animal Models for *Porphyromonas Gingivalis*-Mediated Periodontal Disease. *Trends Microbiol*. 1998 6(11):444-9.

Gersbach CA, Byers BA, Pavlath GK, García AJ. Runx2/Cbfa1 stimulates transdifferentiation of primary skeletal myoblasts into a mineralizing osteoblastic phenotype. *Exp Cell Res*. 2004 300(2):406-17.

Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J, et al. Inhibition of osteoblast differentiation by Tumor Necrosis Factor-Alpha. *Endocrinology*. 2000 141(11):3956-64.

Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, Drissi H, van Wijnen AJ, et al. Expression of the Osteoblast Differentiation Factor Runx2 (Cbfa1/Aml3/PeBP2alpha a) is inhibited by Tumor Necrosis Factor-Alpha. *J Cell Biochem*. 2002 25;277(4):2695-701.

Goldring MB. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep*. 2000 2(6):459-65.

Grabowski P, Macpherson H, Ralston S. Nitric Oxide production in cells derived from the human joint. *Rheumatology*. 1996 35(3):207-12.

Graves DT, Cochran D. The contribution of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor to Periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003 74(3):391-401.

Graves DT, Jiang Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995 6(2):109-18.

Green S, Nacy C. Antimicrobial and immunopathologic effects of cytokine-induced Nitric Oxide Synthesis. *Curr Opin Infect Dis*. 1993 6(3):84-9.

Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy C. Leishmania Major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in ifn-gamma-stimulated macrophages by induction of Tumor Necrosis Factor-Alpha. *J Immunol*. 1990 145(12):4290-7.

Guerreiro R, Santos-Costa Q, Azevedo-Pereira J. As quimiocinas e os seus receptores. *Acta Med Port*. 2011 24(9):67-76.

- Gundberg CM. Biochemical markers of bone formation. Clin Lab Med. 2000 20(3):489-501.
- Gyurko R, Boustany G, Huang PL, Kantarci A, Van Dyke TE, Genco CA, et al. Mice lacking Inducible Nitric Oxide Synthase demonstrate impaired killing of Porphyromonas Gingivalis. Infect Immun. 2003 71(9):4917-24.
- Henderson B, Nair SP. Hard Labour: Bacterial infection of the skeleton. Trends Microbiol. 2003 11(12):570-7.
- Henneman S, Von den Hoff J, Maltha J. Mechanobiology of tooth movement. Eur J Orthod. 2008 30(3):299-306.
- Herman S, Kronke G, Schett G. Molecular mechanisms of inflammatory bone damage: emerging targets for therapy. Trends Mol Med. 2008 14(6):245-53.
- Hibbs Jr J, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric Oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. Biochem Biophys Res Commun. 1988 157(1):87-94.
- Hickey M, Sharkey K, Sihota E, Reinhardt P, Macmicking J, Nathan C, et al. Inducible Nitric Oxide Synthase-Deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. FASEB J. 1997 11(12):955-64.
- Holliday LS, Dean AD, Lin RH, Greenwald J, Gluck S. Low NO concentrations inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures by cgmp-dependent mechanism. Am J Physiol Renal Physiol. 1997 272(3):F283-F91.
- Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. Cytokine Growth Factor Rev. 2001 12(1):9-18.
- Hukkanen MVJ, Platts LAM, De Marticorena IF, O'Shaughnessy M, Macintyre I, Polak JM. Developmental regulation of Nitric Oxide Synthase Expression in rat skeletal bone. J Bone Miner Res. 1999 14(6):868-77.
- Jamal SA, Browner WS, Bauer DC, Cummings SR. Intermittent use of nitrates increases bone mineral density: the study of osteoporotic fractures. J J Bone Miner Res. 1998 13(11):1755-9.
- Jiang Y, Magli L, Russo M. Bacterium-dependent induction of cytokines in mononuclear cells and their pathologic consequences in vivo. Infect Immun. 1999 67(5):2125-30.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008

Kanczler J, Oreffo R. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*. 2008 15(2):100-14.

Kanyama M, Kuboki T, Akiyama K, Nawachi K, Miyauchi FM, Yatani H, et al. Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. *Arch Oral Biol*. 2003 48(10):723-30.

Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell*. 2002 2(4):389-406.

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

Katchburian E, Arana V. Histologia e embriologia oral. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. 390 p.

Katchburian E, Cerri PS. Cirurgia para implantes. São Paulo: Artes Médicas; 2002. 510 p.

Kendall H, Marshall R, Bartold PM. Nitric Oxide and tissue destruction. *Oral Dis*. 2001 7(1):2-10.

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

Koda W, Harada K, Tsuneyama K, Kono N, Sasaki M, Matsui O, et al. Evidence of the participation of peribiliary mast cells in regulation of the peribiliary vascular plexus along the intrahepatic biliary tree. *Lab Invest*. 2000 80(7):1007-17.

Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric Oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunol Today*. 1992 13(5):157-160.

Komatsu D, Hadjiargyrou M. Activation of the Transcription Factor Hif-1 and its target genes, VEGF, HO-1, iNOS, during fracture repair. *Bone*. 2004 34(4):680.

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

Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric Oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--How, Why, When, and Where? *Nitric Oxide*. 1997 1(2):107-120.

Lacey D, Timms E, Tan HL, Kelley M, Dunstan C, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998 93(2):165-76.

Lacey DC, Simmons PJ, Graves SE, Hamilton JA. Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 17(6):735-42.

Ladel CH, Szalay G, Riedel D, Kaufmann S. Interleukin-12 secretion by mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *Infect Immun*. 1997 65(5):1936-8.

Lancaster J. A Tutorial on the diffusibility and reactivity of free Nitric Oxide. *Nitric Oxide*. 1997 1(1):18-30.

Lappin D, Kjeldsen M, Sander L, Kinane D. Inducible Nitric Oxide Synthase expression in periodontitis. *J Periodontal Res*. 2000 35(6):369-73.

Laurent M, Lepoivre M, Tenu JP. Kinetic modelling of the Nitric Oxide gradient generated in vitro by adherent cells expressing Inducible Nitric Oxide Synthase. *Biochem J*. 1996 314(Pt 1):109-13.

Lee SH, Kim TS, Choi Y, Lorenzo J. Osteoimmunology: cytokines and the skeletal system. *BMB Rep* 2008 31;41(7):495-510.

Lee SK, Huang H, Lee SW, Kim KH, Kim KK, Kim HM, et al. Involvement of inos-dependent NO production in the stimulation of osteoclast survival by TNF- α . *Exp Cell Res*. 2004 298(2):359-68.

Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates *trance* and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology*. 1999 140(8):3552-61.

Leenen P, Canono BP, Drevets DA, Voerman J, Campbell PA. TNF-Alpha and IFN-Gamma stimulate a macrophage precursor cell line to kill *listeria monocytogenes* in a Nitric Oxide-Independent manner. *J Immunol*. 1994 153(11):5141-7.

- Li Y, Toraldo G, Li A, Yang X, Zhang H, Qian WP, et al. B Cells and T Cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood*. 2007 1;109(9):3839-48.
- Liew F. Regulation of Nitric Oxide Synthesis in infectious and autoimmune diseases. *Immunol Lett*. 1994 43(1-2):95-8.
- Liew FY, Li Y, Severn A, Millott S, Schmidt J, Salter M, et al. A possible novel pathway of regulation by murine t helper type-2 (th2) cells of a th1 cell activity via the modulation of the induction of Nitric Oxide Synthase on macrophages. *Eur J Immunol*. 1991 21(10):2489-94.
- Lilly GE, Osbon DB, Rael EM, Samuels HS, Jones JC. Alveolar osteitis associated with mandibular third molar extractions. *J Am Dent Assoc*. 1974 88(4):802-6.
- Lloyd SA, Yuan YY, Simske SJ, Riffle SE, Ferguson VL, Bateman TA. Administration of high-dose macrophage colony-stimulating factor increases bone turnover and trabecular volume fraction. *J Bone Miner Metab*. 2009 27(5): 546-54.
- Lohinai Z, Benedek P, Feher E, Gyorfi A, Rosivall L, Fazekas A, et al. Protective Effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. *Br J Pharmacol* 1998 123(3):353-60.
- Long P, Hu J, Piesco N, Buckley M, Agarwal S. Low magnitude of tensile strain inhibits il-1beta-dependent induction of pro-inflammatory cytokines and induces synthesis of il-10 in human periodontal ligament cells in vitro. *J Dent Res*. 2001 80(5):1416-20.
- Lorenzo J, Choi Y, Horowitz M, Takayanagi H. Overview: The developing field of osteoimmunology. *Osteoimmunology: interactions of the immune and skeletal systems*. 2011.
- Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev*. 2008 29(4):403-40.
- Lotz M. The Role of Nitric Oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am*. 1999 25(2):269-82.
- Löwik C, Nibbering P, Van de Ruit M, Papapoulos S. Inducible production of Nitric Oxide in Osteoblast-like cells and in fetal mouse bone explants is associated with suppression of osteoclastic bone resorption. *J Clin Invest*. 1994 93(4):1465-72.

Luna LG. Manual of histologic staining methods of the armed forces. Institute of Pathology: McGraw-Hill New York; 1968.

MacIntyre I, Zaidi M, Alam A, Datta HK, Moonga BS, Lidbury PS, et al. Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic gmp. *Proc Natl Acad Sci*. 1991 88(7):2936-40.

Mackie E. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Biochem Cell Biol*. 2003 35(9):1301-5.

MacLean A, Wei XQ, Huang FP, Al-Alem U, Chan WL, Liew FY. Mice Lacking Inducible Nitric-Oxide Synthase are more susceptible to herpes simplex virus infection despite enhanced Th1 cell responses. *J Gen Virol*. 1998 79(4):825-30.

MacMicking J, Xie Q, Nathan C. Nitric Oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 1997 15(1):323-50.

Mancini L, Moradi-Bidhendi N, Becherini L, Martineti V, MacIntyre I. The biphasic effects of Nitric Oxide in primary rat osteoblasts are cgmp dependent. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 274(2):477-81.

Manolagas SC. Birth and Death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000 21(2):115-37.

Martin RB, Burr DB, Sharkey NA. Skeletal tissue mechanics. New York: Springer; 1998.

McCafferty D, Mudgett J, Swain M, Kubes P. Inducible Nitric Oxide Synthase plays a critical role in resolving intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 1997 112(3):1022-7.

McCartney-Francis NL, Song X, Mizel DE, Wahl SM. Selective inhibition of inducible Nitric Oxide synthase exacerbates erosive joint disease. *J Immunol*. 2001 166(4):2734-40.

McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol*. 2002 73(11):1377-91.

McDermott M. Tnf and Tnfr biology in health and disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2001 47(4):619-35.

Mitchell R. Treatment of fibrinolytic alveolitis by a collagen paste (formula k). A preliminary report. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1986 15(2):127-33.

Miyasaki KT, Bodeau AL, Flemmig TF. Differential killing of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* and *Capnocytophaga* Spp. by human neutrophil granule components. *Infect Immun*. 1991 59(10):3760-7.

Miyasaki KT, Wilson ME, Genco RJ. Killing of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* by the human neutrophil myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system. *Infect Immun*. 1986 53(1):161-5.

Mogi M, Kinpara K, Kondo A, Togari A. Involvement of Nitric Oxide and biopterin in proinflammatory cytokine-induced apoptotic cell death in mouse osteoblastic cell line Mc3t3-E1. *Biochem Pharmacol*. 1999 58(4):649-54.

Mohan VP, Scanga CA, Yu K, Scott HM, Tanaka KE, Tsang E, et al. Effects of Tumor Necrosis Factor Alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun*. 2001 69(3):1847-55.

Moncada S, Higgs A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med*. 1993 329(27):2002-12.

Moncada S, Higgs E. Endogenous Nitric Oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*. 2008 21(4):361-74.

Moncada S, Palmer R, Higgs E. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991 43(2):109-42.

Monjo M, Lamolle SF, Lyngstadaas SP, Ronold HJ, Ellingsen JE. In Vivo expression of osteogenic markers and bone mineral density at the surface of fluoride-modified titanium implants. *Biomaterials*. 2008 29(28):3771-80.

Murad F. Cyclic Guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest*. 1986 78(1):1-5.

Nanci A. *Ten Cate Histologia Oral: desenvolvimento, estrutura e função*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. 432 p.

Nathan C, Xie Q. Regulation of biosynthesis of Nitric Oxide. *J Biol Chem*. 1994 269(19): 13725-8

Newman MG, Takey H, Klokkevold PR, Carranza FA. Periodontia Clínica. Rio de Janeiro: Elsevier; 1997.

Nitzan D, Sperry JF, Wilkins TD. Fibrinolytic activity of oral anaerobic bacteria. Arch Oral Biol. 1978 23(6):465-70.

Noroozi AR, Philbert RF. Modern concepts in understanding and management of the "dry socket" syndrome: comprehensive review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009 107(1):30-5.

Nowzari H, Botero JE, DeGiacomo M, Villacres MC, Rich SK. Microbiology and cytokine levels around healthy dental implants and teeth. Clin Implant Dent Relat Res. 2008 10(3):166-73.

Nussler A, Di Silvio M, Billiar T, Hoffman R, Geller D, Selby R, et al. Stimulation of the Nitric Oxide Synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. J Exp Med. 1992 176(1):261.

Offenbacher S, Odle BM, Braswell LD, Johnson HG, Hall CM, McClure H, et al. Changes in cyclooxygenase metabolites in experimental periodontitis in macaca mulatta. J Periodontal Res. 1989 24(1):63-74.

Okamoto T, Akaike T, Nagano T, Miyajima S, Suga M, Ando M, et al. Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving Nitric Oxide. Arch Biochem Biophys. 1997 342(2):261-74.

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

Oswald IP, Wynn TA, Sher A, James SL. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. Proc Natl Acad Sci. 1992 89(18):8676-80.

Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol. 1990 143(3):420-30.

Palmer RMJ. The L-Arginine: Nitric Oxide pathway. Curr Opin Nephrol Hypertens. 1993 2(1):122.

Parfitt A. Life history of Osteocytes: relationship to bone age, bone remodeling, and bone fragility. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2002 2(6):499-500.

Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal

Parfitt AM. Quantum concept of bone remodeling and turnover: implications for the pathogenesis of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1979;28:1–5.

Parfitt AM. The cellular basis of bone remodeling: the quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone. *Calcif Tissue Int* 1984;36:S37–45.

Penarrocha M, Sanchis JM, Saez U, Gay C, Bagan JV. Oral hygiene and postoperative pain after mandibular third molar surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 92(3):260-4.

Phillips AM. Overview of the Fracture healing cascade. *Injury*. 2005 36 Suppl 3(S)5-7.

Poleti ML. Análise morfométrica, radiográfica e molecular do processo de reparo alveolar após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em ratos *wistar*; morphometric, molecular and radiographic analysis of the alveolar repair process after antimicrobial photodynamic therapy in wistar rats: [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2009.

Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *Lancet*. 2011 9;377(9773):1276-87.

Radomski M, Palmer R, Moncada S. Endogenous Nitric Oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *The Lancet*. 1987 330(8567):1057-8.

Rahnert J, Fan X, Case N, Murphy TC, Grassi F, Sen B, et al. The Role of Nitric Oxide in the mechanical repression of rankl in bone stromal cells. *Bone*. 2008 43(1):48-54.

Ralston S, Grabowski P. Mechanisms of cytokine induced bone resorption: role of Nitric Oxide, cyclic guanosine monophosphate, and prostaglandins. *Bone*. 1996 19(1):29-33.

Ralston S. The Michael Mason Prize Essay 1997. Nitric Oxide and Bone: What a gas! *Rheumatology*. 1997 36(8):831-8.

Ralston SH, Ho LP, Helfrich MH, Grabowski PS, Johnston PW, Benjamin N. Nitric Oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 1995 10(7):1040-9.

Ralston SH, Ho LP, Helfrich MH, Grabowski PS, Johnston PW, Benjamin N. Nitric Oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2009 10(7):1040-9.

Ralston SH, Todd D, Helfrich M, Benjamin N, Grabowski PS. Human Osteoblast-Like cells produce nitric oxide and express Inducible Nitric Oxide Synthase. *Endocrinology.* 1994 135(1):330-6.

Ralston SH, Todd D, Helfrich M, Benjamin N, Grabowski PS. Human Osteoblast-Like cells produce nitric oxide and express Inducible Nitric Oxide Synthase. *Endocrinology.* 1994 135(1):330-6.

Rauner M, Sipos W, Pietschmann P. Osteoimmunology. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007 143(1):31-48.

Reddi A. Bone Morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2001 83(1_suppl_1):S1-S6.

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

Rho J, Takami M, Choi Y. Osteoimmunology: Interactions of the immune and skeletal systems. *Mol Cells.* 2004 17(1):1-9.

Riancho JA, Salas E, Zarrabeitia MT, Olmos JM, Amado JA, Fernández-Luna JL, et al. Expression and functional role of Nitric Oxide Synthase in Osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res.* 1995 10(3):439-46.

Ridderstad A, Abedi-Valugerdi M, Moller E. Cytokines in rheumatoid arthritis. *Annals of medicine.* 1991 23(3):219-23.

Rigamonti E, Touvier T, Clementi E, Manfredi AA, Brunelli S, Rovere-Querini P. Requirement of Inducible Nitric Oxide Synthase for skeletal muscle regeneration after acute damage. *J Immunol.* 2013 190(4):1767-77

Rodan GA. Control of bone formation and resorption: biological and clinical perspective. *J Cell Biochem Suppl.* 1998 30(31):55-61.

Rodrigues MTV, Cardoso CL, Carvalho PSP, Cestari TM, Feres M, Garlet GP, et al. Experimental alveolitis in rats: microbiological, acute phase response and histometric characterization of delayed alveolar healing. *J Appl Oral Sci.* 2011 19(3):260-8.

Rodrigues MTV. Análise microscópica e histométrica comparativa da aplicação de uma pasta à base de metronidazol e da irrigação com iodeto de sódio e peróxido de hidrogênio para o tratamento de alvéolos dentários infectados de ratos. [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2007.

Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 1999;27:1229–41.

Rosbe KW, Mims JW, Prazma J, Petrusz P, Rose A, Drake AF. Immunohistochemical localization of Nitric Oxide Synthase activity in upper respiratory epithelium. *Laryngoscope.* 1996 106(9):1075-9.

Roschger P, Paschalis EP, Fratzl P, Klaushofer K. Bone mineralization density distribution in health and disease. *Bone.* 2008 42(3):456-66.

Ross R, Gillitzer C, Kleinz R, Schwing J, Kleinert H, Förstermann U, et al. Involvement of NO in contact hypersensitivity. *Int Immunol.* 1998 10(1):61-9.

Roux S, Orcel P. Bone Loss: Factors that regulate osteoclast differentiation-an update. *Arthritis Res Ther.* 2000 2(6):451-6.

Rozanis J, Schofield I, Kogon SL. Simulated Dry socket: delayed healing of extraction wounds in rats. *Dent J .* 1976 42(1):41-5.

Rubin J, Rubin C, Jacobs CR. Molecular Pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene.* 2006 367:1-16.

Rud J. Removal of impacted lower third molars with acute pericoronitis and necrotising gingivitis. *Br J Oral Surg.* 1970 7(3):153-60.

Sakou T. Bone Morphogenetic Proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone.* 1998 22(6):591-603.

Scanga CA, Mohan V, Yu K, Joseph H, Tanaka K, Chan J, et al. Depletion of CD4+ T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of Interferon and Nitric Oxide Synthase 2. *J Exp Med*. 2000 192(3):347-58.

Schoedon G, Troppmair J, Fontana A, Huber C, Curtius Hc, Niederwieser A. Biosynthesis and metabolism of pterins in peripheral blood mononuclear cells and leukemia lines of man and mouse. *Eur J Biochem*. 1987 166(2):303-10.

Schytte Blix IJ, Helgeland K. Lps from *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* and production of Nitric Oxide in murine macrophages J774. *Eur J Oral Sci*. 1998 106(1):576-81.

Serbina NV, Flynn JL. Early emergence of CD8+ T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of mycobacterium tuberculosis-infected mice. *Infect Immun*. 1999 67(8):3980-8.

Serrati S, Margheri F, Bruschi S, D'Alessio S, Pucci M, Fibbi G, et al. Plasminogen activators and inhibitor type-1 in alveolar osteitis. *Eur J Oral Sci*. 2006 114(6):500-3.

Shapira L, Frolov I, Ben-Nathan D. Experimental stress suppresses recruitment of macrophages but enhanced their *p. gingivalis* LPS stimulated secretion of Nitric Oxide. *J Periodontol* . 2000 71(3):476-81.

Sheffler LA, Wink DA, Melillo G, Cox GW. Exogenous Nitric Oxide regulates ifn-gamma plus lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in mouse macrophages. *J Immunol*. 1995 155(2):886.

Silva JS, Machado FS, Martins GA. The Role of Nitric Oxide in the pathogenesis of chagas disease. *Front. Biosci*. 2003 18(s3):14-25.

Silva M, Sousa L, Lara V, Cardoso F, Júnior G, Totola A, et al. The role of iNOS and PHOX in periapical bone resorption. *J Dent Res*. 2011 90(4):495-500.

Silva T, Garlet GP, Fukada S, Silva J, Cunha F. chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*. 2007 86(4):306-19.

Silva T, Garlet GP, Fukada S, Silva J, Cunha F. chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*. 2007 86(4):306-19.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005 38(1):135-87.

Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology* 2000. 2000 24(1):99-126.

Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS. Interferon-Gamma and Tumor Necrosis Factor-Alpha determine resistance to *paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol.* 2000 156(5):1811-20.

Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RL, Ago JM. Synergistic interactions between Interleukin 1, Tumor Necrosis Factor, and Lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol.* 1987 1;138(5):1464-8.

Stefanovic-Racic M, Stadler J, Evans C. Nitric Oxide and arthritis. *Arthritis Rheum.* 1993 36(8):1036-44.

Stucki U, Schmid J, Hämmerle C, Lang N. Temporal and local appearance of alkaline phosphatase activity in early stages of guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 2001 12(2):121-7.

Sweet J, Butler D. Increased Incidence of postoperative localized osteitis in mandibular third molar surgery associated with patients using oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol.* 1977 127(5):518-9.

Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontal Res.* 2005 40(4):287-93.

Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol.* 2007 7(4):292-304.

Takeichi O, Saito I, Okamoto Y, Tsurumachi T, Saito T. Cytokine regulation on the synthesis of Nitric Oxide in vivo by chronically infected human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology.* 1998 93(2):275-80.

Taylor-Robinson AW, Liew FY, Severn A, Xu D, McSorley SJ, Garside P, et al. Regulation of the immune response by Nitric Oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol.* 1994 24(4):980-4.

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000 1;289(5484):1504-8.

Torres-Lagares D, Serrera-Figallo M, Romero-Ruiz M, Infante-Cossio P, Garcia-Calderon M, Gutierrez-Perez J. Update on dry socket: a review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005 10(1):81.

Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury*. 2007 38 Suppl 1(S)11-25.

Tsukahara H, Miura M, Tsuchida S, Hata I, Hata K, Yamamoto K, et al. Effect of Nitric Oxide Synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1996 270(5):E840-E5.

Tsukii K, Shima N, Mochizuki S, Yamaguchi K, Kinoshita M, Yano K, et al. Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1 [Alpha], 25-Dihydroxyvitamin D3, Prostaglandin E2, or Parathyroid Hormone in the microenvironment of bone. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 246(2):337-41.

Väänänen HK, Liu Y-K, Lehenkari P, Uemura T. How do osteoclasts resorb bone? *Mater Sci Eng C* 1998;6:205–9.

Van't Hof R, Armour K, Smith L, Armour K, Wei X, Liew F, et al. Requirement of the Inducible Nitric Oxide Synthase pathway for IL-1-Induced osteoclastic bone resorption. *Proc Natl Acad Sci*. 2000 97(14):7993-8.

Van't Hof RJ, Ralston SH. Cytokine-Induced Nitric Oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *J Bone Miner Res*. 1997 12(11):1797-804.

Van'T Hof RJ, Ralston SH. Nitric Oxide and bone. *Immunology*. 2001 103(3):255-61.

Veihelmann A, Landes J, Hofbauer A, Dorger M, Refior HJ, Messmer K, et al. Exacerbation of antigen-induced arthritis in Inducible Nitric Oxide Synthase-deficient mice. *Arthritis Rheum*. 2001 44(6):1420-7.

Vespa G, Cunha FQ, Silva JS. Nitric Oxide is involved in control of trypanosoma cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun*. 1994 62(11):5177-82.

Vezeau PJ. Dental extraction wound management: medicating postextraction sockets. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000 58(5):531-7.

Vieira AE. Caracterização morfológica e molecular do papel de citocinas pró e anti-inflamatórias no processo de reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas e

infeciosas [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2013.

Vieira JGH. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 1999 43(6):415-22.

Vodovotz Y. Control of Nitric Oxide production by transforming growth factor-[beta] 1: mechanistic insights and potential relevance to human disease. *Nitric Oxide*. 1997 1(1):3-17.

Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. Rankl-Rank signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006 12(1):17-25.

Watanuki M, Sakai A, Sakata T, Tsurukami H, Miwa M, Uchida Y, et al. Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in skeletal adaptation to acute increases in mechanical loading. *J Bone Miner Res*. 2002 17(6):1015-25.

Webb J, Polak J, Evans T. Effect of adhesion on Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) production in purified human neutrophils. *Clin Exp Immunol*. 2001 123(1):42-8.

Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol*. 1969 2(6):235-99.

Weiss S, Zimmermann G, Pufe T, Varoga D, Henle P. The systemic angiogenic response during bone healing. *archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2009 129(7):989-97.

Werner H, Woloschak M, Adamo M, Shen-Orr Z, Roberts CT, LeRoith D. Developmental regulation of the rat Insulin-Like Growth Factor I Receptor gene. *Proc Natl Acad Sci*. 1989 86(19):7451.

Wimalawansa SJ. Nitroglycerin therapy is as efficacious as standard estrogen replacement therapy (premarin) in prevention of oophorectomy-induced bone loss: a human pilot clinical study. *J Bone Miner Res*. 2000 15(11):2240-4.

Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997 77(3):509-28.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-

inhibitory factor and is identical to Trance/Rankl. Proc Natl Acad Sci. 1998 95(7):3597.

Yu K, Mitchell C, Xing Y, Magliozzo R, Bloom B, Chan J. Toxicity of Nitrogen oxides and related oxidants on mycobacteria: *M. tuberculosis* is resistant to peroxynitrite anion. Tuber Lung Dis. 1999 79(4):191-8.

Zeidler PC, Hubbs A, Battelli L, Castranova V. Role of Inducible Nitric Oxide Synthase-Derived Nitric Oxide in silica-induced pulmonary inflammation and fibrosis. J Toxicol Environ Health A. 2004 67(13):1001-26.

Zheng H, Yu X, Collin-Osdoby P, Osdoby P. RANKL stimulates Inducible Nitric-Oxide Synthase expression and Nitric Oxide production in developing osteoclasts. An autocrine negative feedback mechanism triggered by RANKL-induced interferon-beta via nf-kappab that restrains osteoclastogenesis and bone resorption. J Biol Chem. 2006 281(23):15809-20.

Apêndices

APÊNDICE A - Fotomicrografia de cortes histológicos obtidos da região média dos alvéolos de camundongos WT-Controle após exodontia nos períodos de 7 e 14 dias, demonstrando como as principais estruturas alveolares foram consideradas. HE, aumento 10x e 40x.

WT-C 7 dias (10x)

C.A. = Cortical Alveolar
I.I. = Infiltrado Inflamatório
M.O. = Matriz Óssea
T.C. = Tecido Conjuntivo
V.S. = Vaso Sanguíneo

WT-C 7 dias (40x)

I.I. = Infiltrado Inflamatório
M.O. = Matriz Óssea
T.C. = Tecido Conjuntivo

WT-C 14 dias (40x)

M.O. = Matriz Óssea
T.C. = Tecido Conjuntivo
V.S. = Vaso Sanguíneo
OB. = Osteoblasto
OC. = Osteoclasto

APÊNDICE B – Fotomicrografia de cortes histológicos obtidos da região média dos alvéolos de camundongos WT e iNOSKO em condições homeostáticas e infecciosas (alveolite experimental) após exodontia nos períodos de 0, 7 e 21 dias. HE, aumento 10x.

APÊNDICE C – Fotomicrografia de cortes histológicos obtidos da região média dos alvéolos de camundongos WT e iNOSKO em condições homeostáticas e infecciosas (alveolite experimental) após exodontia nos períodos de 0, 7 e 21 dias. HE, aumento 40x.

Anexos

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

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

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 024/2011

Bauru, 20 de outubro de 2011.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Caracterização morfométrica e molecular do papel de iNOS no processo de reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas e infecciosas**, de sua autoria e colaboração de Carolina Favaro, Francisconi e dos doutorandos Andréia Espindola Vieira, Carlos Eduardo Palanch Repeke e Elcia Maria Silveira e Rumio Taga, Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis, e das técnicas Tânia Mara Cestari, Daniele Ceolin e Patrícia Mortágua Gemino, foi enviado ao relator para avaliação e considerado **APROVADO** em reunião desta Comissão realizada no dia **18 de outubro de 2011**.

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

Atenciosamente,

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

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

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>